

**Aus dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart**

**Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen
auf die Virulenzfaktoren Alginate und Elastase von
*Pseudomonas aeruginosa***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stefan Oliver Allgaier
aus
Stuttgart
2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.2 Quorum Sensing	10
1.3 Ziel der Arbeit	14

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Stämme von <i>P. aeruginosa</i>	15
2.2 Kulturen	15
2.2.1 Übernachtkulturen	15
2.2.2 Einfrierkulturen	16
2.2.3 Blutagarkulturen	16
2.3 Alginatbestimmung	16
2.3.1 Herstellung von Pseudomonas-Selektions-Platten.....	17
2.3.2 Animpfen der PIA-Platten und Gewinnung der Proben	17
2.3.3 Alginatbestimmung	18
2.3.4 Pierce-Assay.....	19
2.3.5 Eichkurven für den Carbazol- und Pierce-Assay	19
2.3.6 Berechnung der Alginat- und der Proteinmasse aus den Rohdaten	19
2.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT).....	21
2.4.1 Alginatbestimmung durch IIFT, Gewinnung und Bearbeitung der Proben	21
2.4.2 Durchführung des IIFT	22
2.5 Radio-Immuno-Assay (RIA)	23
2.5.1 Radioaktive Markierung der Antikörper (Iodierung)	23
2.5.2 Herstellung der RIA-Platten	24
2.5.3 Gewinnung der Proben	24
2.5.4 Durchführung des RIA	25
2.5.5 Zellzahlbestimmung (CFU)	27
2.5.6 Umrechnung und Darstellung der Daten	27

3. Ergebnisse

3.1 Alginatsynthese von <i>P. aeruginosa</i>	28
3.1.1 Bestimmung der Alginatsynthese mittels Carbazolassay ohne Zusatz von Ciprofloxacin	28
3.1.2 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Alginatsynthese von <i>P. aeruginosa</i> , Bestimmung mittels Carbazolassay	29
3.1.2.1.PAO1.....	29
3.1.2.2 P2	30
3.1.2.3 P3	30
3.1.2.4 P4	30
3.1.2.5 P34	30
3.1.2.6 lasB	31
3.1.3 Bestimmung der Alginatsynthese mittels Indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT)	32
3.2 Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i>	33
3.2.1 Bestimmung der Elastasesynthese mittels RIA ohne Zusatz von Ciprofloxacin	33
3.2.2 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die E- lastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i>	34
3.2.2.1 PAO1	35
3.2.2.2 P2	35
3.2.2.3 P3	36
3.2.2.4 P4	36
3.2.2.5 P34	36
3.2.2.6 7II413.1	36
3.2.2.7 7IIC4.1	36
3.2.2.8 7VIII405.1	37

3.2.3 Einfluss von 50 µM PQS auf die Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i>	38
3.3 Einfluss der Alginatsynthese auf die Elastaseexpression von <i>P. aeruginosa</i>	38
3.3.1 Vergleich der Alginatproduktion mit der Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i> ohne Zusatz von Ciprofloxacin	38
3.3.2 Vergleich Alginat- und Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i> mit Zusatz von subinhibitorischem Ciprofloxacin	39
3.4 Abbildungen.....	41
4. Diskussion	
4.1 Regulation der Virulenzfaktoren Alginat und Elastase von <i>P. aeruginosa</i>	52
4.2 Regulation der Alginatsynthese von <i>P. aeruginosa</i>	53
4.3 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Alginatsynthese von <i>P. aeruginosa</i>	53
4.4 Regulation der Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i>	54
4.5 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Elastasesynthese von <i>P. aeruginosa</i>	55
4.6 Regulation von Alginat im Vergleich zur Elastasesynthese.....	57
5. Zusammenfassung	59
Tabellen	61
Tabellen I	61
Tabellen II	69
Tabellen III	70
Literaturverzeichnis	76

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose und *Pseudomonas aeruginosa*

Mit dem Fortschritt der Medizin und dem steigenden Lebensstandard der Industrienationen haben sich die Schwerpunkte und Aufgaben der Infektionsmedizin gewandelt. Im Vordergrund stehen nicht mehr so sehr die obligat pathogenen Keime, sondern vielmehr die Flora der Umwelt, der Haut und der Schleimhäute, sowie des Intestinaltraktes, welche auf dem Boden akuter oder chronischer Grunderkrankungen zu rezidivierenden Infektionen führt. Aufgrund einer mittlerweile oft weit fortgeschrittenen Resistenzlage gegenüber Antibiotika stellen sie zunehmend ein ernsthaftes Problem dar, erinnert sei zum Beispiel an die in den letzten Jahren immer häufiger auftretende Methicillinresistenz bei *Staphylococcus aureus* (MRSA), oder die natürliche und erworbene Mehrfachresistenz von *P. aeruginosa*.

Eine dieser Grunderkrankungen, die typischerweise mit einer chronischen Infektion einhergeht, ist die Cystische Fibrose (CF). Mit einer Häufigkeit von 1:2500 Lebendgeburten und einer Heterozygotenrate von 1:25, ist sie die häufigste schwere erbliche Stoffwechselerkrankung in der kaukasischen Bevölkerung [5] [13] [19]. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt [37]. Die Pathogenese beruht auf einer Mutation in einem Gen, welches für ein Transmembranprotein kodiert, der Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). Das betreffende Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 [27] [44] [45]. Es gibt mehr als 1000 Mutationen in diesem Gen, die häufigste (in ca. 70% der Fälle) ist jedoch der Verlust von drei Basenpaaren, welcher zur Deletion der Aminosäure Phenylalanin in Position 508 des Proteins führt. Dieses CFTR ist ein Protein der Zellmembran, welches die Eigenschaften eines Chlorid-Kanals aufweist [2] [4] [6] [25][49]. Der Pathomechanismus beruht auf einer Störung des Elektrolytflusses und damit auch der Mukussektion in den Epithelien exokriner Organe [31] [46].

Es kommt zur Bildung eines extrem zähen Mukus mit der Folge eines Sekretstaus. So wird verständlich, dass vor allem der Darm (Mekoniumileus), das Pankreas (Pankreasfibrose) und die Atemwege davon betroffen sind. Für die Lunge bedeutet dies, dass es aufgrund der gestörten Lungenclearance zu chronischen endobronchialen Infektionen kommt, mit der Folge eines bronchiektatischen Emphysems und einer reaktiven Lungenfibrose [43].

Die für die Bronchitiden und Pneumonien verantwortlichen Erreger zeigen eine typische Altersverteilung. So sind über 70% der unter 4-jährigen CF-Patienten mit *S. aureus* und nur etwa 30% mit *P. aeruginosa* infiziert [42], während bei Erwachsenen *P. aeruginosa* mit 80% gegenüber *S. aureus* mit 30% deutlich dominiert. Weitere häufig isolierte Keime sind *Hämophilus influenzae* und Mykobakterien, sowie Aspergillus-Arten [13].

Die fortschreitende Zerstörung des Lungengewebes ist mit 95% die häufigste Todesursache der CF-Patienten. *P. aeruginosa* nimmt also als Erreger eine herausragende Stellung im Krankheitsgeschehen von CF-Patienten ein [14] [15]. Es handelt sich hierbei um ein gramnegatives, 0,5-1 µm dickes und 1,5-5,0 µm langes, polar monotrich begeißeltes und bewegliches Stäbchenbakterium. Das Vorkommen dieses Keimes ist ubiquitär, er bevorzugt feuchtes Milieu, wie etwa Oberflächengewässer, Pflanzen und Lebensmittel, aber auch Beatmungsgeräte, Waschbecken und sogar Desinfektionsmittel, wie quaternäre Ammoniumverbindungen oder 0,02% Chlorhexidinlösung [3]. Die meisten Stämme produzieren unter geeigneten Bedingungen verschiedene Farbstoffe, so das Pyocyanin oder das Pyoverdin [26], daher auch der veraltete Name "Bacterium pyocyaneum" [18] [50]. Bei Kultur auf Schafblutagar zeigen die meisten Stämme eine β-Hämolyse. Die Kolonien werden nach 12-20 h Bebrütung sichtbar. Sie sind von grauer Farbe, flach, gelappt oder ausgefranst. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 36±1°C. Das Krankheitsgeschehen wird zum einen durch die Abwehrlage und zum anderen durch bestimmte Eigenschaften der Erreger, Virulenzfaktoren zu bilden bestimmt. Hier sind das

Alginat, Hämolysine, Elastase, Alkalische Protease und das Exotoxin A von Bedeutung. Das Alginat ist ein komplexes Exopolysaccharid, welches die Bakterienkolonien mit einer Art Schleimhülle, nicht aber im Sinne einer echten Kapsel umgibt. Chemisch ist es aus D-Mannuronsäure, L-Guluronsäure, sowie aus 2,3-O-Acetyl-mannuronsäure aufgebaut (siehe Abb. 1.1) [29] [30]. Diese Polysaccharidschicht stellt einen wirksamen Phagozytoseschutz dar und erweist sich gleichzeitig als Diffusionsbarriere gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmittel und Komplementfaktoren. Manche Stämme produzieren extrem viel Alginat und werden daher als mukoid bezeichnet. Typischerweise werden solche Stämme gehäuft aus der Lunge von CF-Patienten isoliert [14].

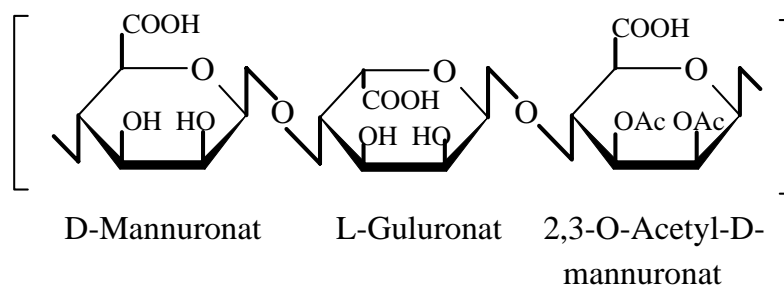


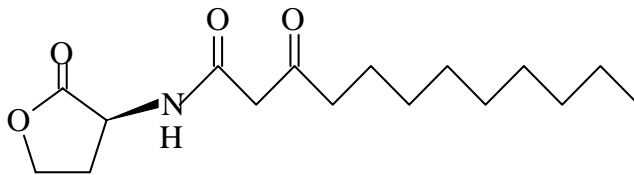
Abb. 1.1 Struktur der Komponenten des Polysaccharids Alginat

Die Elastase und andere Exoproteasen von *P. aeruginosa* sind für das pathologisch anatomische Bild der Infektion mitverantwortlich. Es zeigt sich eine serofibrinöse, fibrinös-eitrige oder hämorrhagische, nekrotisierende Entzündung der Schleimhäute. Die Elastase ist relativ unspezifisch und spaltet auch andere Proteine, wie Immunglobuline und Komplementfaktoren [18]. Diese Exoproteasen sind als Antigen wirksam und bilden im infizierten Organismus Immunkomplexe, welche sich im betroffenen Gewebe anreichern. Durch Bildung chemotaktischer Substanzen werden Neutrophile Granulozyten angelockt, welche zusammen mit durch die Immunkomplexe aktivierten Komplementfaktoren zu einer Entzündung, der Typ III Hypersensitivitätsreaktion führen [10] [20].

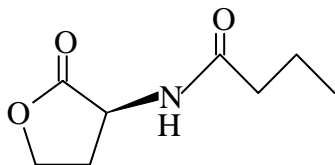
1.2 Quorum Sensing

P. aeruginosa reagiert auf Veränderungen der Umweltbedingungen mit einer Änderung der Genexpression. So induziert Umweltstress, wie O₂-Mangel oder H₂O₂ die Alginatproduktion [33] [53]. Eines dieser Regulationsmechanismen ist das sogenannte Quorum Sensing. Es handelt sich hierbei um ein inter- und intrazelluläres Kommunikations- und Regulationssystem mittels Botenstoffen, den Autoinducern. Ein derartiges System konnte bei vielen gramnegativen Bakterien gefunden werden [23]. Bei *P. aeruginosa* ist vor allem das LasR/LasI und das RhIR/RhII wichtig. LasI und RhII sind die Signalmolekülbildenden Enzyme. In Verbindung mit den Transkriptionsfaktoren LasR und RhIR aktiviert das Signalmolekül die Expression einer ganzen Reihe von Genen. Die Konzentration der Signalmoleküle steigt mit zunehmender Zellzahl an, ihr Effekt hängt also von der Wachstumsphase ab. Es sind bisher 39 solcher Gene bekannt, die durch Autoinducer reguliert werden [28] [36] [51]. Diese Signalmoleküle wirken sowohl in der Zelle, als auch, in den Extrazellulärraum abgegeben, in anderen Zellen, es kommt zu einer positiven Rückkoppelung, die Signalwirkung verstärkt sich selbständig, daher die Bezeichnung Autoinducer, so steigern sowohl LasI, als auch RhII die Synthese von RhII. Die von diesem System regulierten Gene werden in vier Klassen unterteilt [51]. In der Klasse I befinden sich Genen, deren Expression hauptsächlich durch LasI gesteigert wird, RhII hat kaum einen Einfluss, die Kombination beider Moleküle ist etwas effektiver, als RhII allein. Hier befinden sich unter anderem Gene, die für eine Peptidsynthetase, für ein polyaminbindendes Protein und für ein FAD-bindendes Protein kodieren. Die Gene der Klasse II werden nur von LasI reguliert, die Kombination ist weniger effektiv. Diese Gene kodieren unter anderem für ein Transmembranprotein und für Enzyme der Pyoverdinsynthese. Die in der Klasse III zusammengefassten Gene werden durch beide Autoinducer stark aktiviert, die Kombination ist noch um ein vielfaches effektiver. Diese Gene kodieren unter anderem für die RhII-Synthese, für Chloramphenicolresistenz und für Cytochrom p450. Die Gene der Klasse IV werden nur durch die Kombination von LasI und RhII effektiv aktiviert, hier befinden sich unter anderem Gene für die Asparaginsynthese.

Die Elastasesynthese wird von beiden Autoinducern gesteigert, der Effekt von LasI ist dabei ausgeprägter, als der von RhlI [40]. Die Transkriptionsfaktoren besitzen eine N-terminale Domäne, welche den Autoinducer bindet, sowie eine C-terminale Domäne, welche mit der DNA interagiert. Chemisch sind die Autoinducer Homoserinlaktone mit einem Alkylrest, im Falle von LasI handelt es sich um N-(3-oxododekanoyl)-homoserinlaktone und von RhlI um N-butyrylhomoserinlaktone (siehe Abb. 1.2). Es konnte gezeigt werden, dass diese Autoinducer die Expression von lasB, dem elastasekodierenden Gen, steigern, wobei eine deutliche Hierarchie zu beobachten ist, in der Art, dass das Rhl-System vom Las-System abhängt [38] [39] [40] (siehe Abb. 1.3.)



N-(3-oxododekanoyl)-homoserinlaktone



N-butyrylhomoserinlaktone

Abb. 1.2 Struktur von LasI und RhlI

Es wurde jedoch noch ein weiteres Signalmolekül gefunden, welches nicht zu den eigentlichen Autoinducern gezählt wird, da dessen Synthese nicht dichteabhängig ist. Es handelt sich hierbei um 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon, das Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) (siehe Abb. 1.4). Pesci et al. konnten zeigen, dass auch das PQS die Elastaseexpression steigert [41].

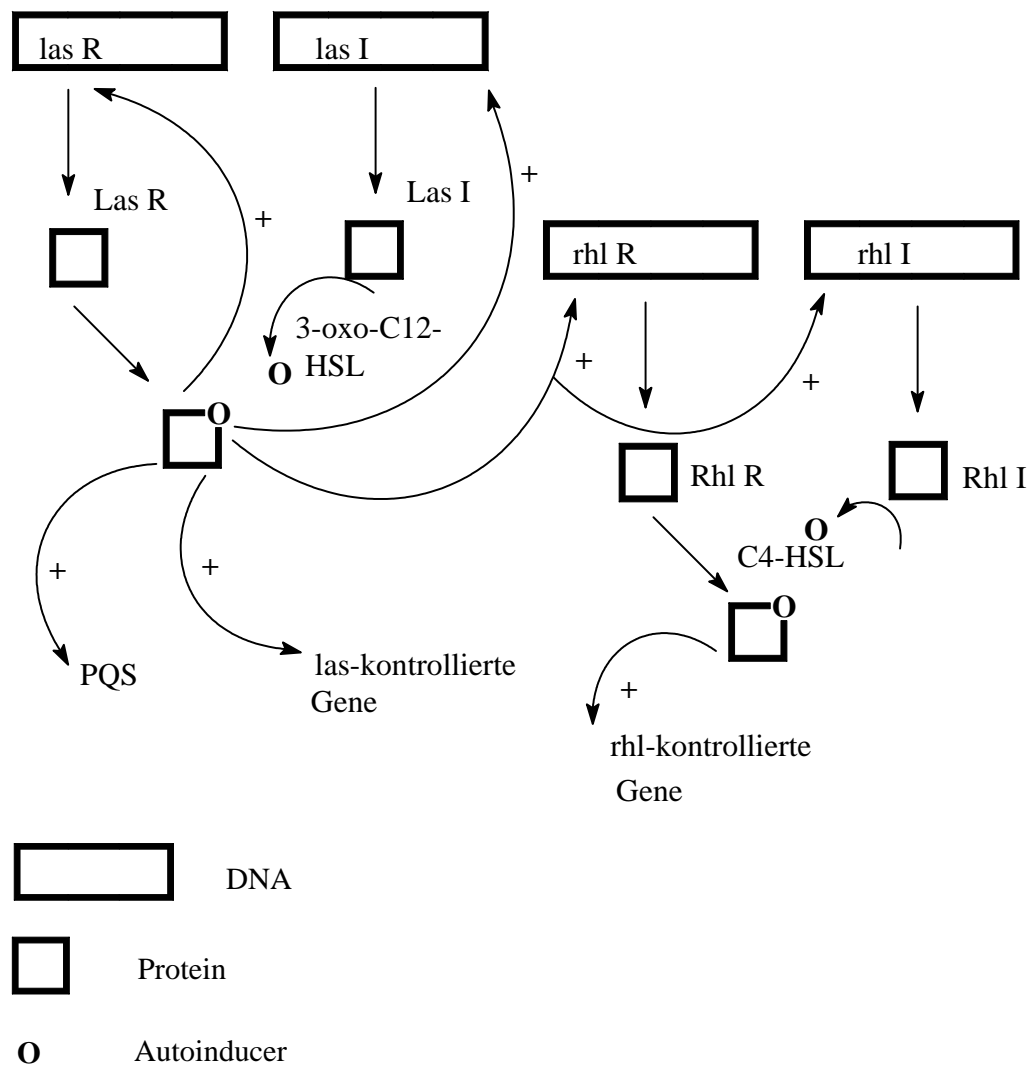


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Autoinducersysteme LasR/ LasI und RhlR/ RhlI

Die Tatsache, dass es sich bei diesem Signalmolekül um ein Chinolon handelt, ist insofern überraschend, als dass sich eine wichtige Antibiotikaklasse von den Chinolonen ableitet, welche gerade zur Behandlung von Pseudomonasinfektionen verwendet wird, die Gyrasehemmer [9]. Besonders die Fluor-Chinolone mit einem Piperazinring an C7, so zum Beispiel das Ciprofloxacin (siehe Abb. 1.4), haben sich als gut wirksam gegen *P. aeruginosa* erwiesen [47]. Angriffspunkt

der Chinolone ist die bakterielle DNA- Topoisomerase (Gyrase), speziell die Untereinheit A. Die Aufgabe der Gyrase besteht in der Einführung einer negativen Windung in die DNA-Helix, dies führt zu einem höheren energetischen Niveau in Form von Torsionsenergie. Diese Energie wird für alle Ablesevorgänge, sowie für die Ausbildung der Superhelices (Supercoiling) benötigt. Diese zusätzliche Verdrillung der DNA-Helix ermöglicht es erst, das DNA-Molekül überhaupt in der Bakterienzelle unterzubringen. Aufgrund der zentralen Rolle dieses Enzyms haben die neueren Gyrasehemmer eine bakterizide Wirkung sowohl auf ruhende, wie auch auf proliferierende Keime. Sie wirken selektiv auf Bakterien, da der Mensch dieses Enzym nicht besitzt. Der Vorteil der Chinolone ist zum einen die Möglichkeit der peroralen Applikation, zum anderen die im Vergleich zu den Aminoglykosiden geringere Toxizität. Weiter ist die Gewebegängigkeit der Chinolone wesentlich besser, als die der β -Laktame oder der Aminoglykoside, so dass sie auch auf intrazelluläre Erreger wirken [32] [47]. Kontraindiziert sind die Gyrasehemmer bei Schwangeren. Bei Kindern vor Abschluss des Längenwachstums und bei Patienten mit zerebralen Krampfleiden sollten sie zurückhaltend verwendet werden, bei der Behandlung von Kindern mit CF ist die Anwendung jedoch vertretbar [32] .

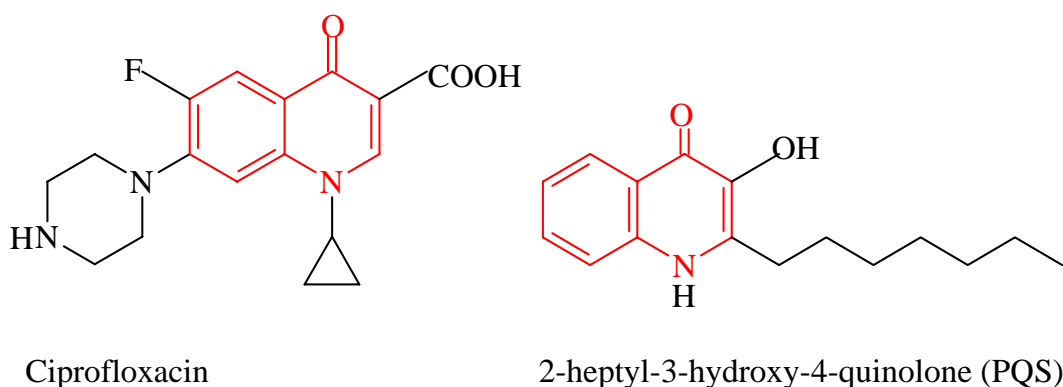


Abb. 1.4 Struktur des Antibiotikums Ciprofloxacin und des Signalmoleküls PQS

Die antibiotische Therapie von Pseudomonasinfectionen bei CF-Patienten gestaltet sich besonders schwierig, sie muss über lange Zeiträume hinweg durchgeführt und häufig wiederholt werden. Bei diesen Patienten ist es kaum möglich, alle Erreger zu eliminieren. Grund dafür ist zum einen der abnorme Mukus, zum anderen das Exopolysaccharid Alginat von *P. aeruginosa*. In einem derartigen Milieu herrschen schlechte Diffusionsverhältnisse, so dass nicht überall ausreichend hohe Antibiotikakonzentrationen erreicht werden. Es kommt dadurch zu einem Bakterienwachstum bei subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen. Die in dieser Arbeit verwendeten subinhibitorischen Ciprofloxacin-Konzentrationen sind also nicht nur ein experimenteller Gedanke, sondern eine in der Praxis häufig auftretende Problematik.

1.3 Ziel der Arbeit

Da phänotypisch mukoide *P. aeruginosa* Stämme besonders häufig bei CF-Patienten vorkommen, werden in dieser Arbeit die Virulenzfaktoren Alginat und Elastase auf eine mögliche Koppelung der Expression oder eine gegenläufige Regulation hin untersucht.

Aufgrund der Strukturähnlichkeit des Signalmoleküls PQS mit den Chinolonantibiotika soll zusätzlich der Einfluss subinhibitorischer Konzentrationen von Ciprofloxacin auf die Synthese dieser Virulenzfaktoren als Umweltstress oder im Sinne eines PQS-Agonismus /Antagonismus untersucht werden. Um die Bedeutung der Autoinducer unter diesen Wachstumsbedingungen mitzuerfassen, werden neben verschiedenen Wildtypen Mutanten mit Defekten in den Autoinducersystemen verwendet. Die Alginatsynthese wird mittels eines chemischen/biochemischen Verfahrens bestimmt und durch ein immunologisches bestätigt. Die Elastasesynthese wird mit einem weiteren immunologischen Verfahren quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Stämme von *P. aeruginosa*

- PAO1: Wildtyp (1) [44]
 - *P. aeruginosa* lasB: dieser Stamm ist eine elastasenegative Mutante [52], es wird also überhaupt keine Elastase gebildet (1)
 - *P. aeruginosa* 7II413.1, 7IIC4.1 und 7VIII405.1: hierbei handelt es sich um Umweltisolate, wobei 7II413.1 einen mukoiden Phänotyp aufweist (1)
 - P3: Wildtyp (2)
 - P2: Elternstamm von P4 und P34, Kanamycin 50 Resistenz (2)
 - P4: Quorum Sensing Defekt-Mutante, der Transkriptionsfaktor LasR wird nicht gebildet, Tetracyclin 40 Resistenz, Kanamycin 50 Resistenz (2)
 - P34: Quorum Sensing Defekt-Mutante, der Transkriptionsfaktor RhlR wird nicht gebildet, Tetracyclin 40 Resistenz, Kanamycin 50 Resistenz (2)
- (1): Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Wilhelmstraße 31, Universität Tübingen, 72074 Tübingen, Deutschland
- (2): School of Pharmaceutical Sciences, Institute of Infections and Immunity, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, England

2.2 Kulturen

2.2.1 Übernachtkultur

Um eine Flüssigkultur zu erhalten, wurden 10 ml TSB (Tryptone Soy Broth, Oxoid Ltd, Basingstoke, England, 15 g in 500 ml Aqua bidest.) in ein 50 ml Kulturröhrchen (Falcon 352070, Becton Dickinson and Company, Franklinlakes, NY, U.S.A.) gegeben. Das sterile Nährmedium wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 18 Stunden lang in einem Schüttelbrutschrank bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute (UpM) inkubiert (Infors HT, Infors GmbH, Stuttgart, Deutschland).

2.2.2 Einfrierkultur

Dieses Verfahren diente dem langfristigen Aufbewahren von Bakterien. Hierzu wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 100 µl sterilen Glycerin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) in ein 2 ml Röhrchen gegeben (Kryo-Röhrchen, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen) und die Kultur bei -73 °C (Tiefkühltruhe Colora UF85-460T, Stiel, Tübingen, Deutschland) gelagert.

2.2.3 Blutagarkulturen

Es handelte sich hier um ein Vollmedium und diente als Nährboden zur Beurteilung der Morphologie der Bakterienkolonien, sowie als Ausgangsmaterial, um Einzelkolonien für das Animpfen weiterer Medien zu gewinnen. Zur Herstellung von Blutagarkulturen wurde das Verfahren des fraktionierten Beimpfens angewandt. Mit einer im Bunsenbrenner ausgeglühten Metallöse wurde eine geringe Menge Bakteriensuspension aus einer Einfrierkultur entnommen und anschließend auf 1/3 der Fläche des Blutagar ausgestrichen. Mit einer weiteren sterilen Öse wurde aus einer Ecke des ersten Drittels heraus ein weiteres ausgestrichen, mit dem letzten Drittel wurde ebenso verfahren. Dann wurde der Agar bei 37 °C 18 h lang in einem Brutschrank inkubiert.

2.3. Alginatbestimmung

Zur Bestimmung des Exopolysaccharids Alginat wurden die zu untersuchenden Pseudomonas-Stämme auf Selektionsplatten zwei Tage kultiviert und die synthetisierte Alginatmenge mit einem Carbazol-Assay quantifiziert. Als Bezugsgröße wurde die entsprechende Bakterienmenge als Proteinmasse mittels Pierce-Assay bestimmt.

2.3.1 Herstellung von Pseudomonas-Selektions-Platten.

Als Nährmedium wurde 22,5 g Pseudomonas Isolation Agar (PIA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) mit 490 ml Aqua dest. und 10ml Glycerin angesetzt und bei 121 °C 20 min lang autoklaviert. Der beim Abkühlen erstarrte Agar wurde in einer Mikrowelle (Panasonic, Tokio, Japan) bei 440 Watt 15 min lang erhitzt und in einem Wasserbad bei 40 °C (Fryka-Therm FT800, Fryka Kältetechnik, Esslingen, Deutschland) warm gehalten. Für die antibiotikumfreie Kontrolle wurde 1 ml steriles Aqua dest. und 9 ml flüssiger PIA in eine Petrischale (Cellstar 633171, Greiner) gegeben und die Flüssigkeiten durch vorsichtiges Kippen ca. eine Minute lang gemischt. Für die antibiotikumhaltigen Platten wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von 0,9 bis 500 µg Ciprofloxacin pro ml mit sterilem Aqua dest. in Zwischenschritten erstellt. Als handelsübliche Infusionslösung lag das Ciprofloxacin in einer Konzentration von 2 mg/ml vor (Ciprobay, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Auch hier wurde 1ml der Antibiotikumlösung mit 9 ml Agar in eine Petrischale gegeben und vermischt.

2.3.2 Animpfen der PIA-Platten und Gewinnung der Proben

Zunächst wurde eine Übernachtskultur der Pseudomonas-Stämme angesetzt. Von dieser wurde eine Verdünnung mit sterilem 0,9 % NaCl auf eine photometrische optische Dichte (OD) von 0,05 bei 600 nm hergestellt (Ultrospec III, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland), was einer Bakterienzahl von 5×10^6 /ml entsprach. Als Referenzwert diente reines 0,9 % NaCl. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf den vorbereiteten Agar pipettiert, dann wurde die Suspension mit einem Glasspatel, welcher zuvor in 70% Ethanol getaucht und abgeflammt wurde, gleichmäßig ausgestrichen. Die solcherart angeimpften Agarplatten wurden bei 37 °C in einem Brutschrank 48 h lang bebrütet.

Zur Alginat- und Proteinbestimmung mussten die Bakterien möglichst vollständig samt Exopolysaccharid von der Agarplatte gelöst werden. Dazu wurden 5 ml steriles Aqua dest. auf die Kultur gegeben, die Bakterienmasse durch vorsichtiges Kippen 5 min lang abgelöst und die entstandene Suspension abpipettiert, wobei darauf zu achten war, dass kein Agar mit aufgenommen wurde.

Ebenso wurde mit einer unbeimpften Agarplatte verfahren, die Lösung diente als Referenzwert zur Bearbeitung der Rohdaten des Carbazol-Assays. Das Resultat wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert (Oak Ridge Centrifuge Tubes, Nalge Company, Rochester, NY, USA) und bei 8000 UpM 30 min lang bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert (J2HS, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto, Ca, USA). Der Überstand wurde abpipettiert und nochmals 30 min bei 8000 UpM zentrifugiert. Das beim ersten Vorgang entstandene Bakterienpellet wurde mit 4 ml 5 % Trichloracetat gelöst und in ein 10 ml-Kulturröhrchen (Cellstar 163160, Greiner) pipettiert. Nach dem zweiten Zentrifugierschritt wurde der alginathaltige Überstand abpipettiert und in einem 10 ml Kulturröhrchen auf Eis zur weiteren Bestimmung verwahrt. Das übriggebliebene Pelett wurde in 1 ml Trichloracetat gelöst und der ersten Portion hinzugefügt, wobei auch diese Proben auf Eis gelagert wurden.

2.3.3. Alginatbestimmung

Verwendet wurde der Carbazol-Assay nach May/Chakrabarty [34] mit geringfügigen Modifikationen. Zunächst wurde eine Boratstammlösung hergestellt (24,74g H₃BO₃ + 45 ml 4 M KOH (Sigma) auf 100 ml Aqua bidest.), diese diente als Ausgangsmaterial für die Boratarbeitslösung, welche für jeden Assay neu hergestellt wurde. Hierfür wurde die Stammlösung langsam erwärmt, um auskristallisiertes Material wieder in Lösung zu bekommen. Ein Teil der Boratlösung wurde mit 40 Teilen 95,7 % H₂SO₄ (Sigma) (v/v) verdünnt und auf Eis gelagert, die 0,1 % (w/v) Carbazollösung (Sigma) wurde mit 99,9% Ethanol hergestellt und ebenfalls auf Eis gelagert. In gekühlte Safe-Lock-Cups (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden 870 µl Boratarbeitslösung mit 101 µl des alginathaltigen Überstandes gegeben, 4 sec lang gevortext (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz), 29 µl Carbazollösung hinzugegeben und das ganze wurde nochmals 4 sec lang gevortext. Anschließend wurden alle Cups 30 min lang in einem Heizblock bei 55 °C inkubiert (Ori-Block 001, Techne, Roland Vetter, Ammerbuch, Deutschland). Nach dieser Zeit wurde der Inhalt der Cups in Halb-Mikro-Küvetten gegeben und die Absorption bei

530 nm gemessen, als Referenzwert diente 870 µl Boratarbeitslösung + 101 µl Aqua dest.+ 29 µl Carbazollösung.

2.3.4 Pierce-Assay

Um eine Bezugsgröße zur gemessenen Alginatmenge zu erhalten, wurde die entsprechende Proteinmasse mittels Pierce-Assay bestimmt (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL, USA). Die Arbeitslösung wurde für jeden Assay neu angesetzt, indem 50 Teile des Reagenz A mit einem Teil des Reagenz B angemischt wurden. Für die eigentliche Messung wurden 50 µl der proteinhaltigen Trichloracetatlösung in Halb-Mikro-Küvetten mit 950 µl der Arbeitslösung gegeben. Die Ansätze wurden genau 30 min lang bei 37 °C inkubiert und dann sofort die Absorption bei 562 nm gemessen, als Leerwert diente hier 950 µl Arbeitslösung mit 50 µl Aqua dest.

2.3.5 Eichkurven für den Carbazol- und Pierce-Assay

Um aus den gemessenen Absorptionen die jeweilige Protein- und Alginatmasse bestimmen zu können, wurde für beide Assays eine Standardkurve erstellt.

Für die Proteinbestimmung wurde Albumin (Albumin, Bovine, Sigma Steinheim) in einer Konzentration von 50 µg/ml bis 2000 µg/ml in Aqua bidest. gelöst und der Pierce-Assay durchgeführt. Die gemessenen Absorptionen bei 562 nm wurden in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abb. 2.1).

Zur Ermittlung einer Absorptionseichkurve wurde Alginat (Sigma) in Konzentrationen von 10 µg/ml bis 1000 µg/ml in Aqua bidest. gelöst und wie beschrieben der Carbazol-Assay durchgeführt, auch diese Messwerte wurden in einer Eichgeraden dargestellt (siehe Abb. 2.2).

2.3.6 Berechnung der Alginat- und der Proteinmasse aus den Rohdaten

Von den Absorptionswerten der Carbazol-Assays wurde als Referenzwert der Absorptionwert einer unbeimpften Agarplatte abgezogen. Die Differenz wurde

mittels Eichkurve in die entsprechende Alginatkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet. Die Alginatkonzentration wurde ins Verhältnis zur Proteinmasse gesetzt, wobei der resultierende Wert in $\mu\text{g Alginat/} \mu\text{g Protein}$ angegeben wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse wurden in Abhängigkeit der Antibiotikumkonzentration in Diagrammen dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student T-Test für unpaare Daten und zweiseitiger Fragestellung errechnet.

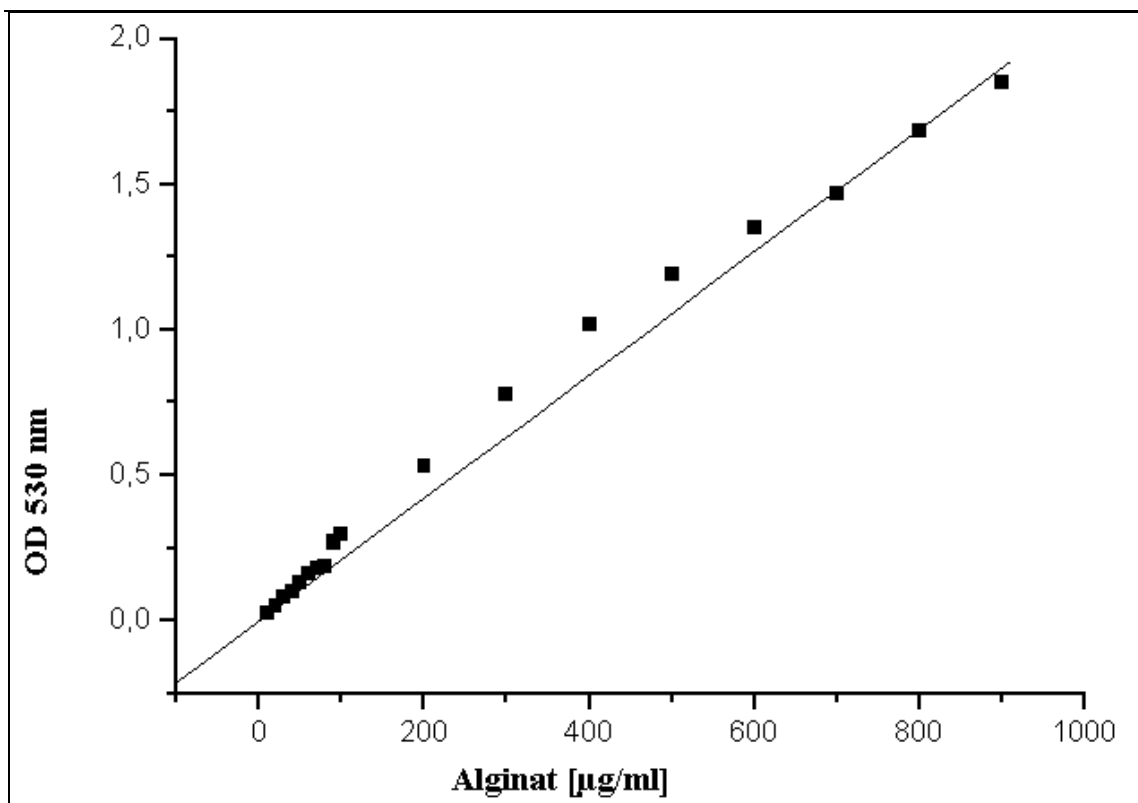


Abb. 2.1 Eichkurve für Alginat

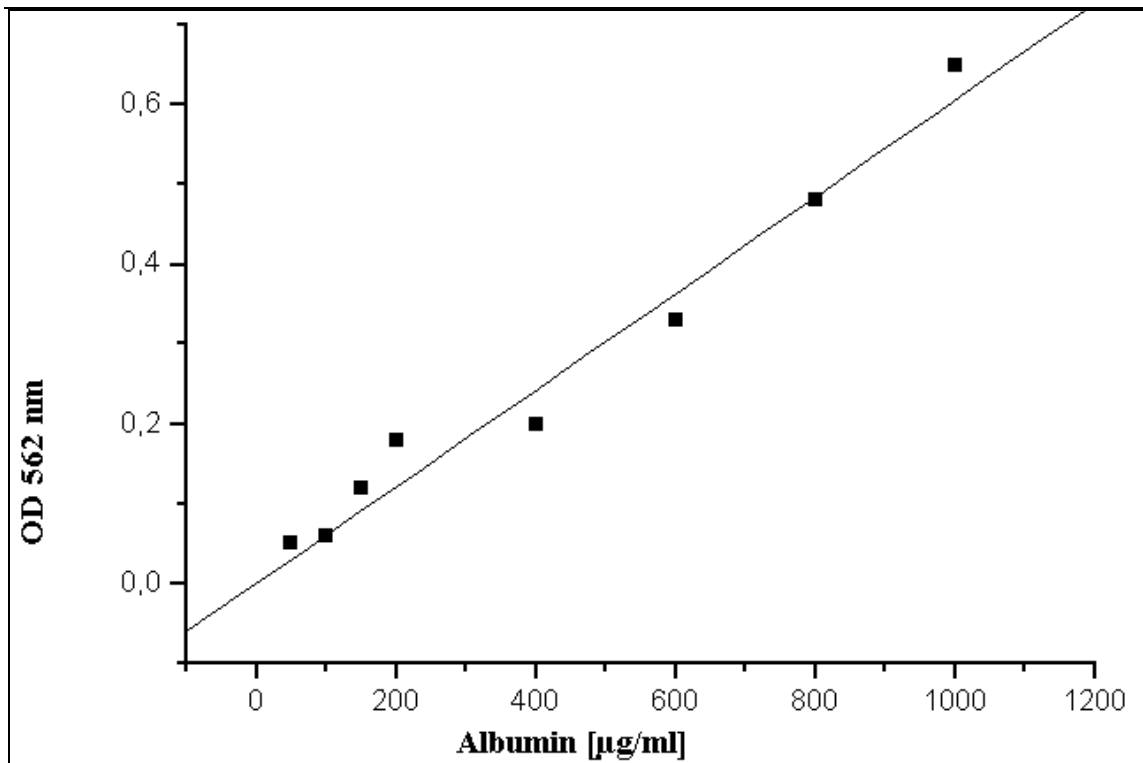


Abb. 2.2 Eichkurve für Protein

2.4. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Der IIFT dient dem Nachweis eines bestimmten, fixierten Antigens mittels eines spezifischen Antikörpers. Dieser Antikörper wird, wenn das Antigen vorhanden ist, gebunden und somit ebenfalls immobilisiert. Der Nachweis erfolgt mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Durch Intensitätsmessung der Fluoreszenz kann das Antigen semiquantitativ bestimmt werden.

2.4.1 Alginatebestimmung durch IIFT, Gewinnung und Bearbeitung der Proben

Als Proben wurden *P. aeruginosa*-Stämme auf ciprofloxacinhaltigen PIA-Platten kultiviert, analog der Probengewinnung für den Carbazol-Assay. Nach zwei Tagen Bebrütung wurde je eine Bakterienkolonie mit einer ausgeglühten Metallöse von dem Agar entnommen. Verwendet wurden Kulturen, die auf anti-

biotikumfreien PIA und solche, die bei $\frac{1}{2}$ MHK (Minimale Hemmkonzentration) gewachsen waren.

2.4.2 Durchführung des IIFT

Die Bakterienkolonie wurde auf einem Objektträger mit 10 μ l PBS ausgestrichen, insgesamt je Probe zwei Objektträger, einen für den Nachweis, den anderen für die Negativkontrolle. Nach dem Trocknen wurden die Bakterien mit 50 μ l Formalin 4 % 10 min lang fixiert. Dann wurde das Formalin mit einer Wasserstrahlpumpe wieder abgesaugt, 50 μ l PBS hinzugefügt und wieder abgesaugt, dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde auf das Präparat Schweineserum, 1/10 mit PBS (v/v) verdünnt, gegeben (Dako A/S, Glostrup, Dänemark). Nach 30 min Inkubationszeit in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurde das Präparat, wie oben beschrieben, mittels Wasserstrahlpumpe und PBS gewaschen. Dann wurde auf ein Präparat der erste Antikörper gegeben, nicht jedoch auf die Negativkontrolle. Als Antikörper wurde anti-Alginat IgG aus Kaninchen verwendet, welches 1/20 (v/v) mit PBS verdünnt war (freundliche Gabe von Gerald B. Pier, Channing Laboratory, Harvard Medical School, Boston, Mass., U.S.A.). Es wurden 50 μ l der Antikörperlösung auf das Präparat gegeben, eine Stunde lang inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Dann wurde der zweite Antikörper hinzugegeben und zwar sowohl für den Alginatnachweis, als auch für die Kontrolle. Es handelte sich hierbei um einen, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten Antikörper, der aus Ziegen gewonnen worden und gegen Kaninchen-IgG gerichtet war (Dianova-Immunotech Vertriebsgesellschaft mbH., Hamburg, Deutschland). Dieser Antikörper wurde 1/500 mit PBS verdünnt, 50 μ l auf das Präparat gegeben und dann 30 min lang inkubiert. Zum Schutz des lichtempfindlichen Farbstoffs wurde von nun an im Dunkeln gearbeitet. Nach weiterem Waschen wurde ein Farbstoff hinzugegeben, welcher DNA markiert, um die einzelnen Bakterien lokalisieren zu können. Verwendet wurde dazu Di-

amidino-phenylindol-2HCl (DAPI) (Serva) in einer Verdünnung von 1/1000. Von dieser Farbstofflösung wurden 50 µl aufgetragen, 5 min lang inkubiert und wieder gewaschen, nun aber mit Aqua dest. Nach dem Trocknen wurde das Präparat mit einem Einbettmedium (Dako) und einem Deckglas versehen. Nach 24 Stunden war das Medium ausgehärtet und das Präparat konnte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht werden. Durch Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz (Wincam 2.2 Densitometer, Cybertech, Berlin, Deutschland) konnten Rückschlüsse auf Konzentrationsunterschiede des Alginats pro Bakterium gezogen werden.

2.5 Radio-Immuno-Assay (RIA)

Der RIA ist ein hochsensibles und spezifisches quantitatives Nachweisverfahren für ein bestimmtes Antigen mittels eines spezifischen Antikörpers, welcher mit I^{125} radioaktiv markiert wurde.

Prinzip:

Eine Mikrotiterplatte wurde mit Antikörper (IgG) gegen das zu bestimmende Antigen beschichtet. Diese Platte wurde mit einer Eichreihe bekannter Antigenkonzentrationen, sowie einer Probe ohne Antigen als Leerwert und Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Probe inkubiert. Das Antigen wurde an die Antikörper gebunden und somit immobilisiert. Danach wurde der markierte Antikörper hinzugegeben, inkubiert und der nicht gebundenen Anteil abgewaschen. Mit der gemessenen Radioaktivität konnte anhand der Eichreihe die Antigenmenge quantifiziert werden.

2.5.1 Radioaktive Markierung der Antikörper (Iodierung)

Die Markierung des gereinigten IgG, welches gegen Elastase von *P. aeruginosa* gerichtet war (Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Tübingen) erfolgte nach der Chloramin-T-Methode nach Hunter und Greenwood [21]. Zu

nächst wurden 10 µl der Antikörpersuspension in einer Konzentration von 10 mg/ml mit 20 µl 0,4 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.4 (Merck) und 10 µl NaI¹²⁵ (1mCi) (Amersham Buchler GmbH und CoKG, Braunschweig) versetzt. Durch Zugabe von 10 µl einer Chloramin-T-Lösung (Merck) in einer Konzentration von 1mg/ml wurde der Iodierungsvorgang gestartet und nach 45 sec mit 10 µl einer Natriumdisulfidlösung (1mg/ml, Merck) gestoppt. Um die iodierten Antikörper zu stabilisieren, wurde 200 µl Rinderalbuminlösung (BSA) 5 % in PBS hinzugefügt. Um das nicht gebundene I¹²⁵ abzutrennen, wurden die markierten Antikörper in eine PD10-Säule (1,5 x 8 cm) mit einem Flüssigkeitsvolumen von 2,5 ml gegeben, dann wurde die Säule mit 25 ml BSA gespült und das IgG mit 2,5 ml BSA eluiert. Das freie I¹²⁵ blieb in der Säule zurück. Die Antikörpersuspension wurde mit BSA 5 % auf eine Aktivität von 100000 counts per minute (CPM) pro 100 µl verdünnt, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung zu erhalten.

2.5.2 Herstellung der RIA-Platten

Als Trägermaterial wurden Mikrotiterplatten (Falcon Microtest III 96-Slot-Platten, flexibel, Becton Dickinson) verwendet. Die Slots wurden jeweils mit 100 µl einer Antikörpersuspension (10 µg/ml in PBS mit Azid) beschichtet, dann mit Falcon Microtest III Flexiblelid abgedeckt und 24 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Antikörper an der Oberfläche der Slots anhaften. Der Antikörper war gereinigtes Kaninchen IgG gegen Pseudomonas-Elastase. Als nächstes wurden die Platten dreimal mit PBS mit Azid gewaschen und mit 100 µl BSA 5 % pro Slot abgesättigt (BSA 5%, 5 g BSA in 100 ml PBS mit Azid). Diese Mikrotiterplatten wurden mit Klebefolie (Permacel, Multimed Wicke GmbH, Postfach 1344, 73221 Kirchheim u. Teck) verschlossen und bei 4°C bis zum weiteren Gebrauch verwahrt.

2.5.3 Gewinnung der Proben

Die zu untersuchenden Pseudomonas-Stämme wurden in Flüssignährmedien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ciprofloxacin 18 h lang kultiviert. An

geimpft wurde mit Bakterien einer Übernachtskultur, welche bei 6000 UpM 10 min lang zentrifugiert wurde (Heraeus Minifuge RF, Heraeus Instruments GmbH, 70736 Stuttgart, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml PBS aufgelöst und wieder zentrifugiert, dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt und diente dazu, extrazelluläre Elastase aus dem Medium zu entfernen. Die solcherart gewonnene Bakteriensuspension wurde auf eine OD von 0,05 mit PBS verdünnt und jeweils 50 µl davon wurden zum Animpfen der Medien verwendet. Als antibiotikumfreie Kontrolle diente 4,5 ml TSB mit 500 µl sterilem Aqua dest. Für die antibiotikumhaltigen Proben wurden zunächst Ciprofloxacinverdünnungen in Zwischenschritten von 15,6 bis 0,45 µg/ml mit Aqua dest. hergestellt. Davon wurden jeweils 500 µl in 4,5 ml TSB gegeben, was einer Endkonzentration von 1,56 bis 0,045 µg/ml entsprach. Die angeimpften Proben wurden in 50 ml Gefäßen bei 180 UpM und 37 °C 18 h lang inkubiert. Die antibiotikumfreie Kontrolle diente als Referenzwert, die erste und zweite Verdünnungsstufe, bei der es zum Bakterienwachstum kam, sowie eine Konzentration, die 1/10 der Stufe entsprach, bei der gerade noch kein Wachstum zu beobachten war, wurden als Proben verwendet, das entsprach dann einer Antibiotikumkonzentration von $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{10}$ MHK. Von diesen Proben wurde jeweils 1 ml in sterile Safe-Lock-Cups pipettiert, um damit die Zellzahl zu bestimmen, der Rest (4 ml) bei 6000 UpM 10 min lang zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Bakterienpellet verworfen.

Zur Herstellung der Proben mit PQS als Zusatz, wurden 65 µg synthetisches PQS (freundliche Gabe von P. Williams, Institute of Infections and Immunity, Nottingham, England) in 65 µl Methanol 99% gelöst und dies in 5 ml TSB gegeben, was einer Endkonzentration von 50 µM entsprach, wie auch von Pesci et al. beschrieben [41].

2.5.4 Durchführung des RIA

Von dem elastasehaltigen Überstand wurden nun Verdünnungsreihen von 10^{-2} bis 10^{-5} mit PBS mit Azid in 10er Schritten erstellt. Um die gemessene Radioak

tivität quantifizieren zu können, wurde eine derartige Verdünnungsreihe mit gereinigter Elastase (1mg/ml) als Eichreihe erstellt (Nagase Biochemicals Ltd, Fukuchiyama Factory, Fukuchiyama City, Japan), wobei hiervon 10^{-2} bis 10^{-7} verdünnt wurde. Als Leerwert wurde das Nährmedium TSB in denselben Verdünnungen verwendet. Die vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden nun geöffnet und das BSA 5 % mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, dann 100 µl PBS mit Azid in die Slots gegeben und wieder abgesaugt, der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nun wurden die Proben aufgetragen. Die erste Reihe war die Eichreihe mit den bekannten Elastasekonzentrationen, wobei immer in zwei Slots die gleiche Konzentration aufgetragen wurde, um eine Doppelmessung zu ermöglichen. Die zweite Reihe enthielt die TSB-Verdünnungen, die folgenden dann die Proben. Wichtig war, dass für jeden RIA eine neue Eichreihe erstellt wurde, da die Aktivität der markierten Antikörper gemäß dem radioaktiven Zerfall ständig abnahm. Weiterhin sei noch angemerkt, dass sämtliche Arbeiten mit radioaktiven Materialien unter Beachtung der Sicherheitsvorschriften in dafür geeigneten Räumen stattfanden. Die beladenen Mikrotiterplatten wurden anschließend mit Folie wieder abgeklebt, wobei darauf zu achten war, dass keine Flüssigkeit von einem Slot in einen anderen gelangte. Die Platten wurden nun 18 h lang bei 4 °C inkubiert und dann wieder in der oben beschriebenen Art und Weise dreimal gewaschen. Um die gebundene Elastase zu detektieren, wurden 100 µl der markierten Antikörpersuspension pro Slot hinzugegeben und die Platten wieder abgeklebt. In einem für radioaktive Materialien geeigneten Kühlschrank wurden die Mikrotiterplatten dann wieder 18 h lang bei 4 °C inkubiert. Nach den 18 h wurde der nicht gebundenen Anteil an Antikörpern durch dreimaliges Waschen entfernt, wobei jedoch keine Wasserstrahlpumpe, sondern einen Sauger für radioaktive Stoffe verwendet wurde. Die gewaschenen Platten wurden wieder abgeklebt, dann die einzelnen Slots ausgeschnitten und ein Gammacounter damit bestückt, um die Aktivität in counts per minute (CPM) zu messen (Multicrystal Gammacounter LB2101, Berthold, Wildbad, Deutschland). Anhand der Eichreihe konnte nun nach Abzug

des Leerwertes unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe die Elastase in $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden.

2.5.5 Zellzahlbestimmung (CFU)

Um eine Bezugsgröße für die ermittelte Elastasekonzentration zu erhalten, wurde die entsprechende Zellzahl der einzelnen Proben bestimmt. Dazu wurde $10\ \mu\text{l}$ der Kultur in $990\ \mu\text{l}$ steriles PBS ohne Azid gegeben und dann jeweils in 10er Schritten bis zu einer Konzentration von 10^{-9} in sterilen Safe-Lock-Cups verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ auf Müller-Hinton-Testagar mit einem abgeflammtten Glasspatel ausgestrichen. Die Agarplatten wurde anschließend 24 h lang bei $37\ ^\circ\text{C}$ in einem Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Verdünnungsstufe ausgezählt, bei der die einzelnen Kolonien gut voneinander abzugrenzen waren. Die ausgezählte Kolonienzahl wurde dann mit dem Kehrwert der Verdünnung und dann noch mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten (colony forming units, CFU).

2.5.6 Umrechnung und Darstellung der Daten

Um eine übersichtliche Zahl zu erhalten, wurde die ermittelte Menge an Elastase auf 10^9 Zellen pro ml umgerechnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration dargestellt.

3. Ergebnisse

Die zu den jeweiligen Ergebnissen gehörenden Abbildungen und Photographien befinden sich unter 3.3 Abbildungen.

3.1. Alginatsynthese von *P. aeruginosa*

3.1.1 Bestimmung der Alginatsynthese mittels Carbazolassay ohne Zusatz von Ciprofloxacin

Die absoluten Alginatwerte wurden auf die Proteinmasse bezogen und als μg Alginat pro μg Protein dargestellt. Es zeigte sich eine moderate Alginatsynthese der Wildtypen PAO1, P3, 7IIC4.1, 7VIII405.1, sowie der LasR- und der RhIR-Negativmutanten, einschließlich deren Elternstamm P2. Der elastasenegative Stamm lasB, sowie der Wildtyp 7II413.1 zeichneten sich durch eine starke Alginatsynthese aus, so dass hier von einem mukoiden Phänotyp gesprochen werden kann. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 und in Tabelle 3.1 dargestellt. Alle Untersuchungen wurden nach zweitägiger Bebrütung auf PIA bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 3.1 Alginatsynthese von *P. aeruginosa*

Stamm	Alginatsynthese ¹			Stamm	Alginatsynthese		
	MW	SD	n		MW	SD	n
PAO1	0,058 ± 0,033		3	lasB	0,117		2
P2	0,041 ± 0,019		3	7II413.1	0,147 ± 0,053		3
P3	0,036		2	7IIC4.1	0,031 ± 0,006		3
P4	0,025 ± 0,009		4	7VIII405.1	0,017 ± 0,008		3
P34	0,036 ± 0,018		4				

¹ μg Alginat / μg Protein; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n);

3.1.2 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Alginsynthese von *P. aeruginosa*, Bestimmung mittels Carbazolassay

Bei den untersuchten Stämmen ließ sich die Alginsynthese durch subinhibitorische Konzentrationen des Antibiotikums induzieren. Das Ausmaß der Alginsynthese zeigte das Maximum bei der höchsten Ciprofloxacinkonzentration mit Ausnahme von lasB, hier erreichte sie ihr Maximum bei ¼ MHK. Bei niedrigeren Konzentrationen ging die Produktion wieder auf Normalwerte zurück. Insgesamt variierte der Umfang der induzierbaren Alginsynthese von Stamm zu Stamm um etwa den Faktor 9, es reagierten also nicht alle Stämme mit gleicher Intensität auf das Antibiotikum. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2; 3.3 und Abb. 3.2 - 3.9 dargestellt. Alle Untersuchungen wurden nach zweitägiger Bebrütung auf PIA bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 3.2 Alginsynthese von *P. aeruginosa* bei subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen

Stamm	n	Alginsynthese ¹									
		H ₂ O		½ MHK		¼ MHK		1/8 MHK		1/16 MHK	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
PAO1	3	0,059±0,038		0,277±0,178		0,295±0,108		0,116±0,028		0,060±0,011	
P2	3	0,041±0,019		0,443±0,174		0,179±0,074		0,089±0,041			
P3	2	0,036		1,000		0,463		0,482		0,100	
P4	4	0,025±0,009		0,174±0,070		0,099±0,069		0,051±0,016		0,048±0,022	
P34	4	0,036±0,018		0,734±0,477		0,505±0,226		0,117±0,087			
LasB	2	0,117		0,373		0,405		0,091		0,078	

¹ µg Alginat / µg Protein; Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.1.2.1 PAO1

Die MHK für diesen Stamm betrug auf PIA 1,56 µg Ciprofloxacin/ml. Bei ½ MHK fand sich eine Erhöhung der Alginsynthese um das 5-fache (p = 0,05), bei ¼

MHK war es ebenfalls das 5-fache ($p < 0,01$) und bei 1/16 MHK schließlich wieder der Ausgangswert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt.

3.1.2.2 P2

Die MHK dieses Elternstammes von P4 und P34 betrug 0,78 μg Ciprofloxacin/ml. Hier erreichte die Alginatsynthese ihr Maximum bei $\frac{1}{2}$ MHK mit dem 11-fachen des Ausgangswertes ($p < 0,05$), bei der niedrigsten gemessenen Konzentration von 1/8 MHK immer noch das 2-fache. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt.

3.1.2.3 P3

Dieser Wildtyp zeigte einen ausgeprägten Anstieg der Alginatsynthese mit dem 28-fachen bei $\frac{1}{2}$ MHK, dem 13-fachen bei $\frac{1}{4}$ ($p = 0,07$) und 1/8 MHK gegenüber der antibiotikumfreien Kontrolle. Die MHK betrug 3,12 μg Ciprofloxacin/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 dargestellt.

3.1.2.4 P4

Die LasR-negative Mutante zeigte eine dem Elternstamm vergleichbare Zunahme der Alginatsynthese mit dem 7-fachen bei $\frac{1}{2}$ ($p < 0,01$) und dem 4-fachen bei $\frac{1}{4}$ MHK. Die MHK war mit 1,56 μg Ciprofloxacin/ml jedoch geringfügig höher, als die von P2. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 dargestellt.

3.1.2.5 P34

Die RhIR-negative Mutante zeigte mit 0,78 μg Ciprofloxacin/ml die gleiche MHK, wie der Elternstamm P2, die induzierbare Alginatsynthese war jedoch mit dem 20-fachen bei $\frac{1}{2}$ MHK ($p < 0,05$) und dem 14-fachen bei $\frac{1}{4}$ MHK ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle deutlich ausgeprägter, als bei ihrem Elternstamm. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt.

3.1.2.6 lasB

Die elastasenegative Mutante zeigte von allen untersuchten Stämmen die geringste Steigerung der Alginateproduktion. Sie betrug nur das 3-fache für $\frac{1}{2}$ MHK ($p = 0,11$) und das 4-fache für $\frac{1}{4}$ MHK ($p = 0,65$), bei $\frac{1}{8}$ MHK war sie wieder auf dem Niveau des Ausgangswertes, aufgrund der geringen Unterschiede und der Streuung konnte keine signifikante Induktion der Alginate synthese festgestellt werden. Die MHK war mit $6,25 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml deutlich höher, als die der anderen untersuchten Stämme. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt.

Um einen direkten Vergleich des Verhaltens der untersuchten Stämme unter subinhibitorischen Ciprofloxacin-Konzentrationen zu erhalten, wurden die absoluten Messergebnisse der Alginate synthese in Prozent der Mittelwerte der antibiotikumfreien Kontrolle (=100 %) in Tabelle. 3.3 und in Abb. 3.8 und Abb. 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.3 Alginate synthese von *P. aeruginosa* bei subinhibitorischen Ciprofloxacin-

Stamm	Konzentrationen					
	Alginate synthese ¹					
	$\frac{1}{2}$ MHK			$\frac{1}{4}$ MHK		
	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	470±	300	3	500±	180	3
P2	1080±	430	3	440±	180	3
P3	2780		1	1290		2
P4	690±	280	4	400±	270	4
P34	2040±	1320	4	1400±	630	4
lasB	320		2	350		1

¹ Alginate synthese in % zur Kontrolle; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD),

Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK), Anzahl der Messungen (n)

3.1.3 Bestimmung der Alginatsynthese mittels Indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT)

Der IIFT ist vor allem ein qualitatives Verfahren zum Nachweis eines bestimmten Antigens. Durch Auswertung der Fluoreszenzintensität können jedoch semi-quantitative Rückschlüsse gezogen werden.

Untersucht wurden die Stämme PAO1, P2 und P4 nach zweitägigem Wachstum auf PIA mit $\frac{1}{2}$ MHK Ciprofloxacin und ohne Antibiotikum. Die Intensität wurde mittels Win-cam 2.2 Densitometer bestimmt. Es konnte eine verstärkte Intensität der Fluoreszenz und damit indirekt eine gesteigerte Alginatsynthese bei Wachstum auf antibiotikumhaltigem Medium im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz geht nicht linear mit der Zunahme des Antigens einher, da der Antikörper die Oberfläche und nicht das Volumen markiert. Daher konnte eine gesteigerte Alginatsynthese nachgewiesen werden, eine quantitative Auswertung war jedoch nicht möglich. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Exemplarisch wurde die Fluoreszenzmarkierung für den Stamm P2 ohne Antibiotikum, bei $\frac{1}{2}$ MHK und als Kontrolle ohne den ersten Antikörper in Abb. 3.10, Abb. 3.11 und Abb. 3.12 fotografisch dargestellt. Es war eine deutlich ausgeprägtere Fluoreszenz um die zentral gelegene Zellgruppe in Abb. 3.11 im Vergleich zu Abb. 3.10 zu erkennen, entsprechend einer vermehrten Alginatsynthese unter Ciprofloxacin-Einfluss. Das Fehlen eines DAPI-Nachweises trotz vorhandener Immunfluoreszenz erklärt sich durch das Vorhandensein von Antigen, wie etwa Zelloberflächen und dem Fehlen von DNA. Als Nachweis, dass der zweite Antikörper tatsächlich nur an den ersten Antikörper bindet, wurde in Abb. 3.12 der erste Antikörper nicht hinzugegeben, es war trotz Vorhandensein von Zellen, wie aus der DAPI-Färbung ersichtlich, keine Fluoreszenz zu erkennen.

Tabelle 3.4 Bestimmung der Alginatsynthese mittels IIFT

Stamm	Fluoreszenzintensität ¹					
	H ₂ O			½ MHK ²		
	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	97 ± 11		6	121 ± 29		5
P2	75 ± 21		5	99 ± 7		4
P4	87 ± 10		8	120 ± 17		7

¹ Intensität in IE; ² Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.2. Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

3.2.1 Bestimmung der Elastasesynthese mittels RIA ohne Zusatz von Ciprofloxacin

Alle Werte sind in µg Elastase pro ml Flüssigmedium, bezogen auf eine Zellzahl von 10⁹ pro ml angegeben. Die Wildtypen PAO1, 7VIII405.1 und P3, sowie der Elternstamm P2 zeigten eine moderate Elastaseproduktion. Die elastasenegative Mutante lasB wurde einmal untersucht und wie zu erwarten war, konnte keine Elastase nachgewiesen werden. Die LasR-negative Mutante P4 produzierte sehr wenig Elastase, etwa 1/80 im Vergleich zum Elternstamm P2, die gemessenen Werte befanden sich nahe der unteren Nachweisgrenze. Die RhlR-negative Mutante P34 zeigte ebenfalls eine verminderte Elastasesynthese, etwa 1/10 gegenüber dem Elternstamm. Die Wildtypen 7II413.1 und 7IIC4.1 zeigten mit dem 2- bis 4-fachen gegenüber den anderen Wildtypen eine ausgeprägte Elastaseproduktion. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 und in Tabelle 3.5 dargestellt. Alle Untersuchungen wurden nach 18 h Bebrütung in TSB bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 3.5 Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Stamm	Elastasesynthese ¹		n
	MW	SD	
PAO1	10,73±10,4		4
P2	6,100±2,51		3
P3	8,150		2
P4	0,075±0,01		3
P34	0,575		2
las B	< 0,001		1
7II413.1	25,80±11,6		3
7IIC4.1	22,40±3,56		3
7VIII405.1	2,033±0,55		3

¹ µg Elastase / ml; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.2.2 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Die untersuchten Stämme reagierten mit der Elastasesynthese unterschiedlich auf subinhibitorische Ciprofloxacinkonzentrationen im Nährmedium. Die Wildtypen PAO1, P3 und 7VIII405.1, sowie der Elternstamm P2 und die RhlR-negative Mutante P34 zeigten einen Anstieg der Elastasesynthese. Die Ergebnisse der LasR-negativen Mutante P4 sind wenig aussagekräftig, da alle Messwerte im unteren Bereich der Nachweisgrenze lagen. Die Stämme 7II413.1 und 7IIC4.1, welche ohne Zusatz von Ciprofloxacin relativ hohe Elastasewerte aufwiesen, zeigten unter Einfluss des Antibiotikums einen Abfall der Elastasesynthese. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6; 3.7 und in Abb. 3.14 – 3.21; dargestellt. Die MHK war bei allen untersuchten Stämmen im Flüssigmedium TSB

niedriger, als in PIA. Alle Untersuchungen wurden nach 18 h Bebrütung bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 3.6 Elastasesynthese von *P. aeruginosa* bei subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen

Stamm	Elastasesynthese ¹											
	H ₂ O			½ MHK			¼ MHK			1/10 MHK		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	10,73±10,4		4	117,5±42,1		4	30,50		2	8,333±3,06		3
P2	6,100±2,51		3	135,3±69,4		4	38,50		2	5,900±1,61		3
P3	8,150		2	146,0±58,1		3	117,5		2	17,63±6,09		3
P4	0,075±0,01		3	0,390±0,21		4	0,955		2	1,566±0,21		3
P34	0,575		2	7,925±6,50		4	2,700		2	1,500±0,20		3
7II413.1	25,80±11,6		3	12,80±5,56		3	6,900±4,41		3	24,87±9,20		3
7IIC4.1	22,40±3,56		3	7,350		2	4,450		2	-		
7VIII405.1	2,033±0,55		3	-			14,85		2	3,300		2

¹ µg Elastase / ml; Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.2.2.1 PAO1

Dieser Wildtyp zeigte einen Anstieg der Elastasesynthese um das 11-fache bei ½ MHK ($p < 0,01$), bei ¼ MHK war sie immer noch um das 3-fache erhöht und bei 1/10 MHK lagen die Werte wieder im Normbereich. Die MHK betrug 0,09 µg Ciprofloxacin/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.14 dargestellt.

3.2.2.2 P2

Der Elternstamm für P4 und P34 zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme der Elastasesynthese mit dem 22-fachen im Vergleich zur Kontrolle bei ½ MHK ($p < 0,05$), auch hier lagen die Werte bei 1/10 MHK wieder im Normbereich. Die MHK betrug 0,045 µg Ciprofloxacin/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 dargestellt.

3.2.2.3 P3

Der Wildtyp P3 reagierte auf $\frac{1}{2}$ MHK mit einem den Stämmen PAO1 und P2 vergleichbaren Anstieg der Elastasesynthese, hier um den Faktor 18 ($p = 0,05$), bei $\frac{1}{4}$ MHK immer noch um den Faktor 14 und bei $\frac{1}{10}$ MHK noch um den Faktor 2. Die MHK betrug $0,09 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 dargestellt.

3.2.2.4 P4

Die Elastasesynthese dieses LasR-negativen Stammes war so gering, dass die gemessenen Schwankungen nicht aussagekräftig waren. Die MHK betrug $0,09 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml.

3.2.2.5 P34

Dieser RhlR-negative Stamm zeigte bei $\frac{1}{2}$ MHK eine um das 14-fache ($p = 0,21$) und bei $\frac{1}{4}$ MHK um das 4-fache ($p < 0,05$) erhöhte Elastasesynthese die mit abnehmender Ciprofloxacinkonzentration wieder zurückging. Die MHK betrug $0,045 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17 dargestellt.

3.2.2.6 7II413.1

Dieser Wildtyp zeigte bei $\frac{1}{2}$ MHK einen Abfall der Elastasesynthese auf 50% des Ausgangswertes, bei $\frac{1}{4}$ MHK waren es noch 30% ($p = 0,06$). Bei $\frac{1}{10}$ MHK stieg die Synthese wieder in den Normbereich. Die MHK betrug $0,78 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml, die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 dargestellt.

3.2.2.7 7IIC4.1

Auch dieser Wildtyp reagierte auf $\frac{1}{2}$ MHK mit einem Abfall der Elastasesynthese auf 30% ($p < 0,05$), bei $\frac{1}{4}$ MHK waren es noch 20% ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Die MHK betrug $1,56 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml, die Ergebnisse sind in Abb. 3.19 dargestellt.

3.2.2.8 7VIII405.1

Dieser Wildtyp zeigte bei $\frac{1}{4}$ MHK einen Anstieg der Elastasesynthese auf das 7-fache der Norm ($p = 0,09$), der bei $\frac{1}{10}$ MHK wieder auf das 2-fache zurückging. Die MHK betrug $1,56 \mu\text{g}$ Ciprofloxacin/ml, die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Für den direkten Vergleich der untersuchten Stämme unter subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen wurden die absoluten Elastasesynthesewerte in Prozent der antibiotikumfreien Kontrolle (=100%) in Tabelle 3.7 und in Abb. 3.21 dargestellt.

Tabelle 3.7 Elastasesynthese von *P. aeruginosa* bei subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen

Stamm	<u>Elastasesynthese¹</u>					
	$\frac{1}{2}$ MHK			$\frac{1}{4}$ MHK		
	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	1100± 400		4	290		2
P2	2220± 1140		4	630		2
P3	1790± 710		3	1450		2
P34	1380± 1120		4	470		2
7II413.1	50± 20		3	30± 20		3
7IIC4.1	30		2	20		2
7VIII405.1				750		2

¹Elastasesynthese in % zur Kontrolle; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n), Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK)

3.2.3 Einfluss von 50µM PQS auf die Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Die Untersuchung wurde exemplarisch mit dem Wildtyp P3 durchgeführt, das Nährmedium war TSB bei 37°C und 18 h Bebrütung. Es konnte keine Änderung der Elastasesyntheserate mittels RIA bei 50µM PQS gemessen werden, alle Werte lagen im Bereich der Kontrolle, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8 Einfluss von 50µg PQS auf die Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Stamm	Elastasesynthese ¹					
	H ₂ O			50µM PQS		
	MW	SD	n	MW	SD	n
P3	8,150		2	8,200 ± 0,78		3

¹ µg Elastase / ml ; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.3 Einfluss der Alginsynthese auf die Elastaseexpression von *P. aeruginosa*

3.3.1 Vergleich der Alginatproduktion mit der Elastasesynthese von *P. aeruginosa* ohne Zusatz von Ciprofloxacin

Die absoluten Alginatwerte, dargestellt in µg Alginat pro µg Protein wurden in Abhängigkeit zur Elastasesynthese in µg Elastase pro ml und 10⁹ Zellen dargestellt. Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Stämme miteinander verglichen. Um die Ergebnisse auf eine mögliche Korrelation zwischen der Alginat- und der Elastasesynthese hin zu untersuchen wurden die Werte in einem Diagramm aufgetragen und der Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Sollte eine positive Korrelation vorliegen sollten Werte im Bereich von

$r = + 1$, bei einer negativen Korrelation Werte im Bereich von $r = - 1$ vorliegen. Der Korrelationskoeffizient dieser Werte zeigte mit $r = 0,411$, dass die Alginate- und die Elastasesynthese nach diesen Ergebnissen nicht miteinander korrelieren, es besteht also weder eine gleichsinnige, noch eine inverse Koregulation. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 und in Abb. 3.22 dargestellt.

Tabelle 3.9 Vergleich der Alginate- und der Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Stamm	Alginate ¹			Elastasesynthese ²		
	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	0,059±	0,033	3	10,73±	10,4	4
P2	0,041±	0,019	3	6,100±	2,51	3
P3	0,036		2	8,150		2
P4	0,025±	0,009	4	0,075±	0,01	3
P34	0,036±	0,018	4	0,575		2
LasB	0,117		2	< 0,001		
7II413.1	0,147±	0,053	3	25,80±	11,6	3
7IIC4.1	0,031±	0,006	3	22,40±	3,56	3
7VIII405.1	0,017±	0,008	3	2,033±	0,55	3

¹ µg Alginate / µg Protein; ² µg Elastase / ml; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

3.3.2 Vergleich der Alginate- und Elastasesynthese von *P. aeruginosa* mit Zusatz von subinhibitorischem Ciprofloxacin

Alle untersuchten Stämme reagierten auf subinhibitorisches Ciprofloxacin mit einer Induktion der Alginate¹synthese. Falls eine inverse Koregulation vorliegen sollte, so wäre eine verminderte Elastaseexpression zu erwarten. Die Stämme PAO1, P2, P3, P34 zeigten eine Steigerung der Elastasesynthese, der Stamm P4 produzierte weiterhin nur sehr wenig Elastase. Die Mittelwerte der Alginate- und Elastasesynthese wurden miteinander verglichen und der Korrelationskoeffizient wurde bestimmt. Dieser zeigte mit $r = -0,086$ für ½ MHK keine Korrelation

dieser beiden Parameter. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 und in Abb. 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.10 Vergleich der Alginate- und Elastasesynthese von *P. aeruginosa* unter subinhibitorischen Ciprofloxacin-Konzentrationen

Stamm	$\frac{1}{2}$ MHK						$\frac{1}{4}$ MHK			
	<u>Alginate¹-</u>			<u>Elastase²-</u>			<u>Alginate -</u>			<u>Elastase-</u>
<u>synthese</u>	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW
PAO1	0,277±	0,178	4	117,5±	42,1	4	0,295±	0,108	4	30,50
2										
P2	0,443±	0,174	3	135,3±	69,4	4	0,179±	0,074	3	38,50
2										
P3	1,000		1	146,0±	58,1	3	0,463		2	117,5
2										
P4	0,174±	0,070	4	0,390±	0,21	4	0,099±	0,069	4	0,955
2										
P34	0,734±	0,477	4	7,925±	6,50	4	0,505±	0,226	4	2,700
2										

¹ µg Alginate / µg Protein; ² µg Elastase / ml; Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n), Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK)

3.4 Abbildungen

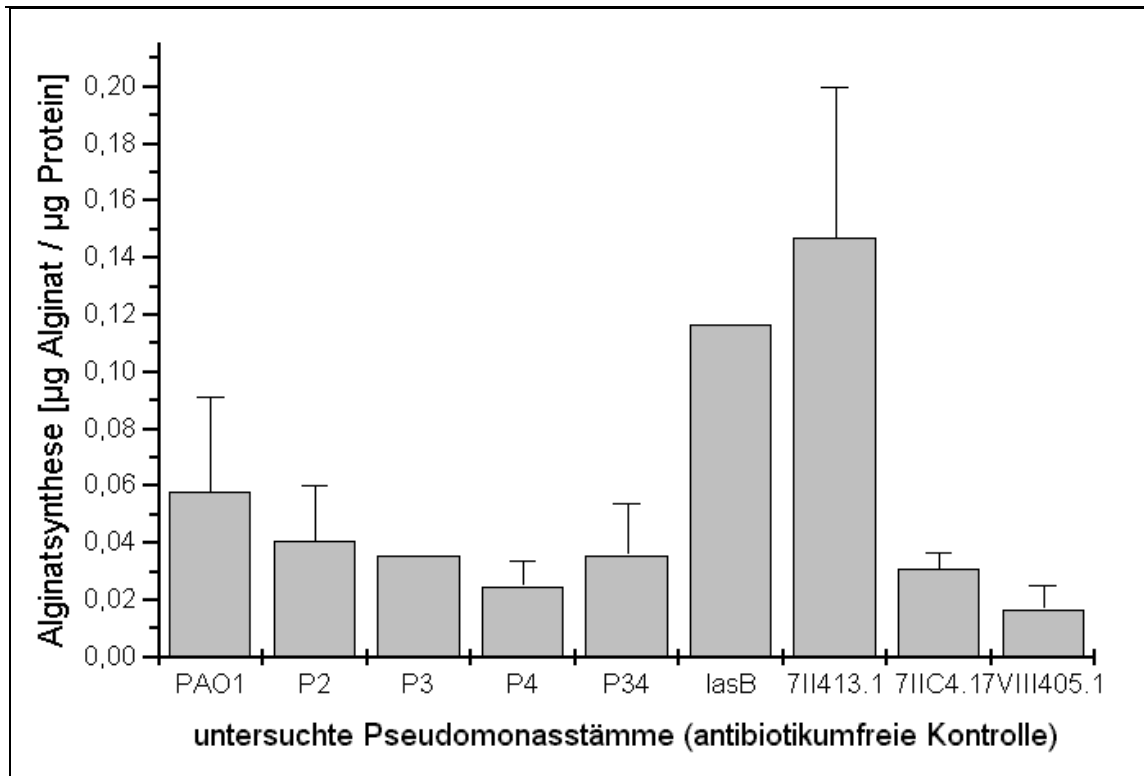


Abb. 3.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Alginatsynthese der untersuchten Stämme

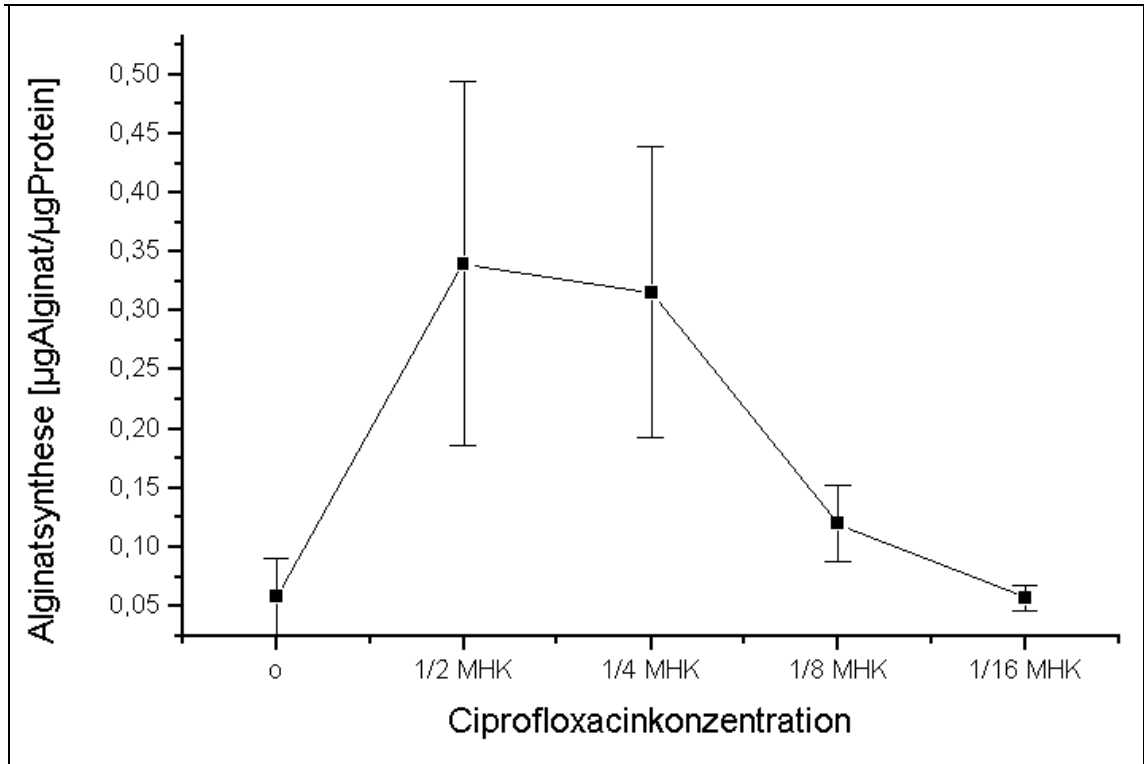


Abb. 3.2 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginatproduktion von PAO1

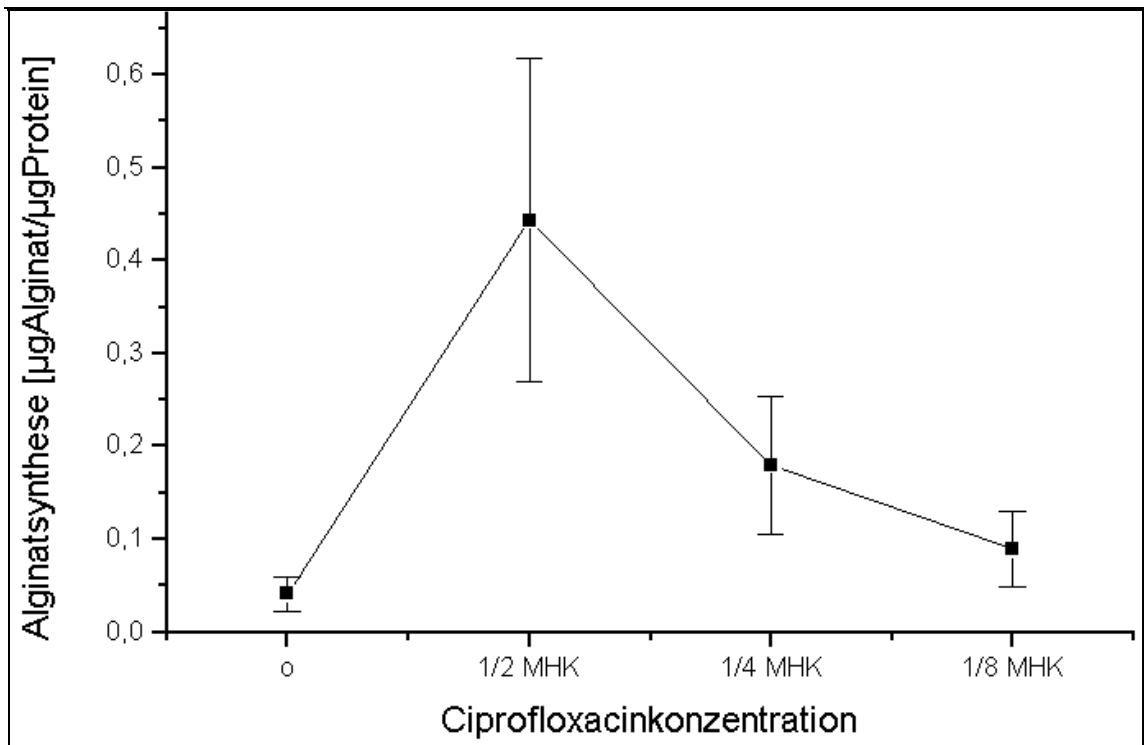


Abb. 3.3 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginatproduktion von P2

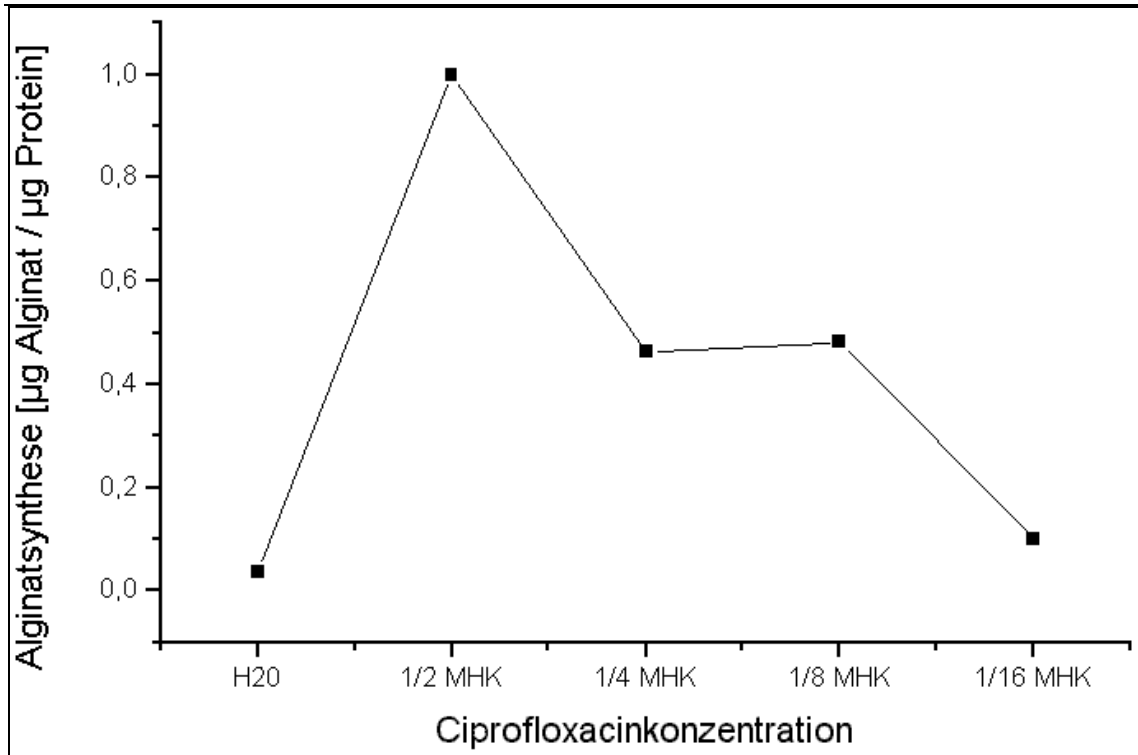


Abb. 3.4 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginatproduktion von P3

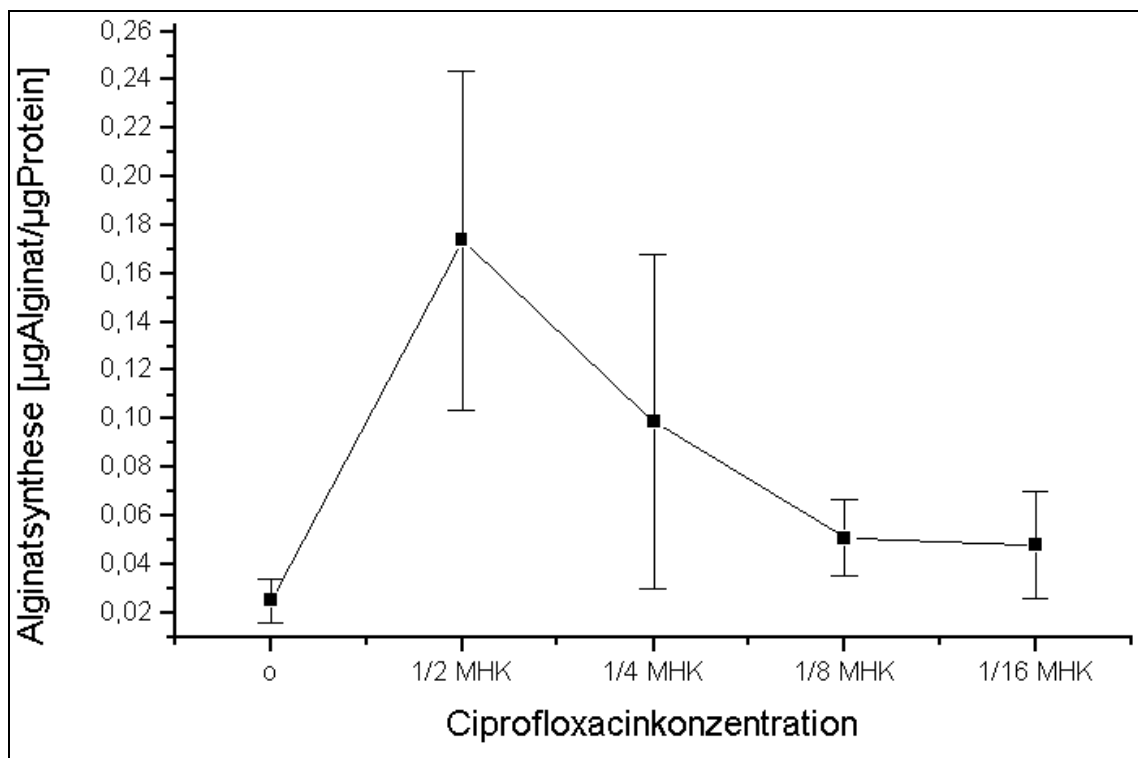


Abb. 3.5 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginatproduktion von P4

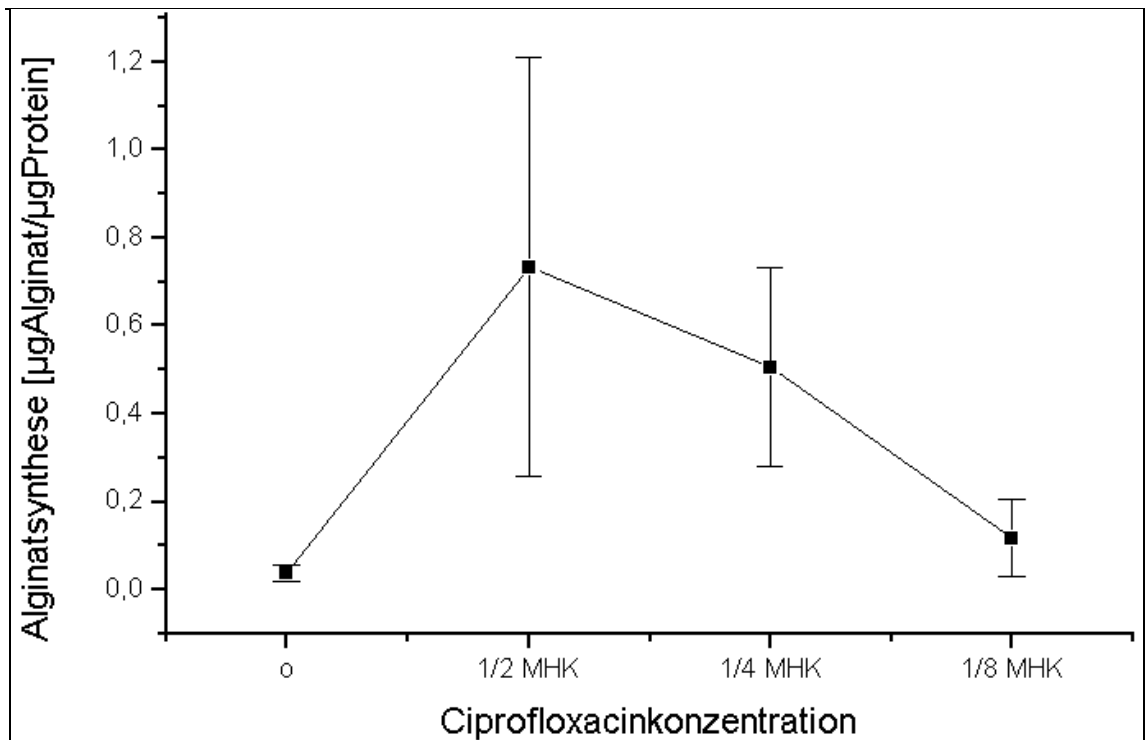


Abb. 3.6 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginateproduktion von P34

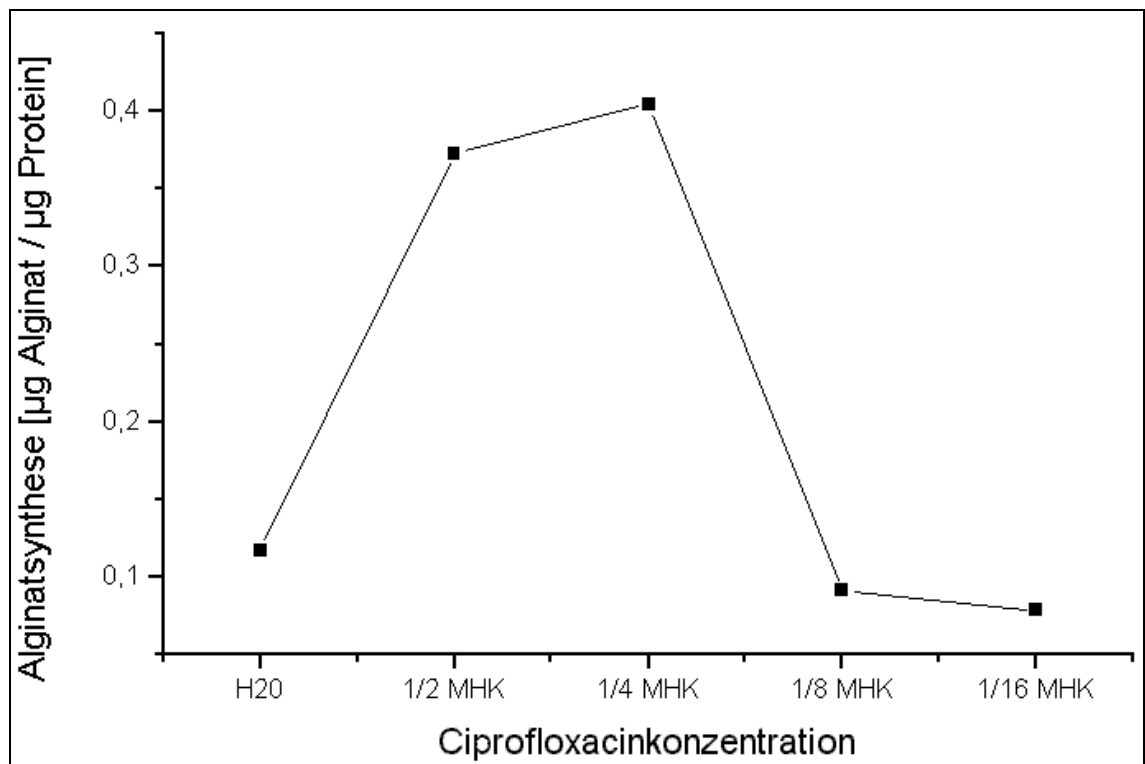


Abb. 3.7 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Alginateproduktion von lasB

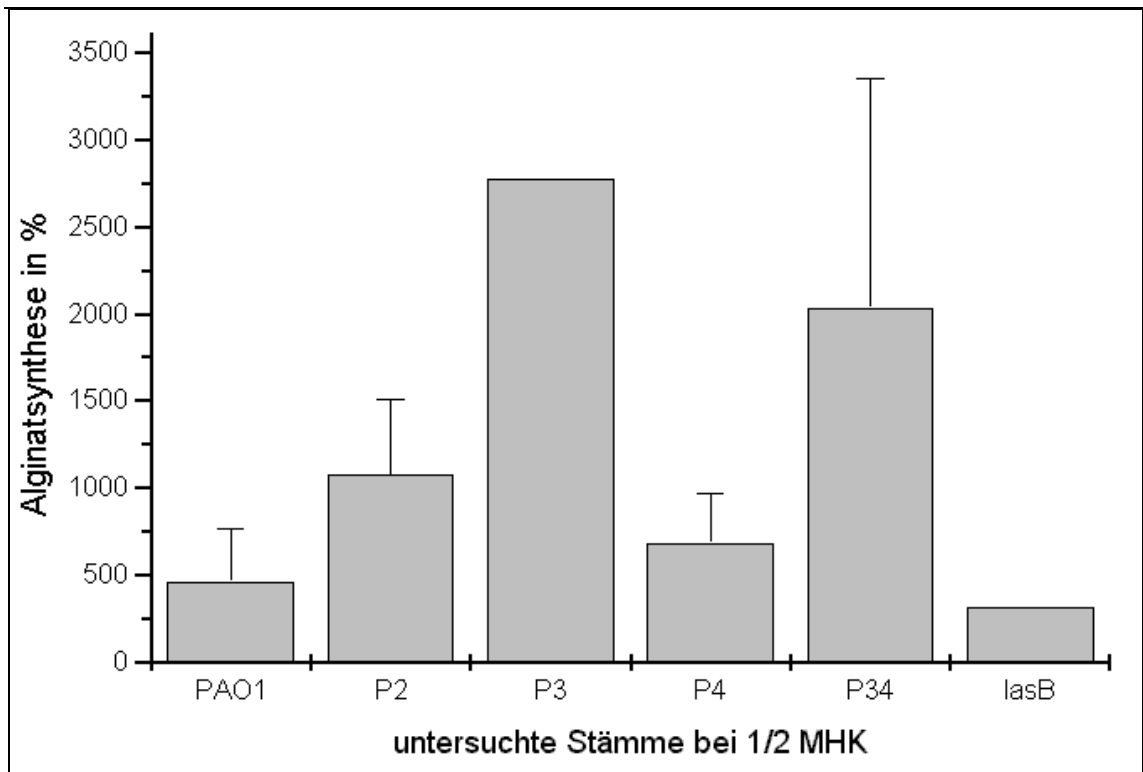


Abb. 3.8 Alginatsynthese bei $\frac{1}{2}$ MHK Ciprofloxacin (Kontrolle = 100%)

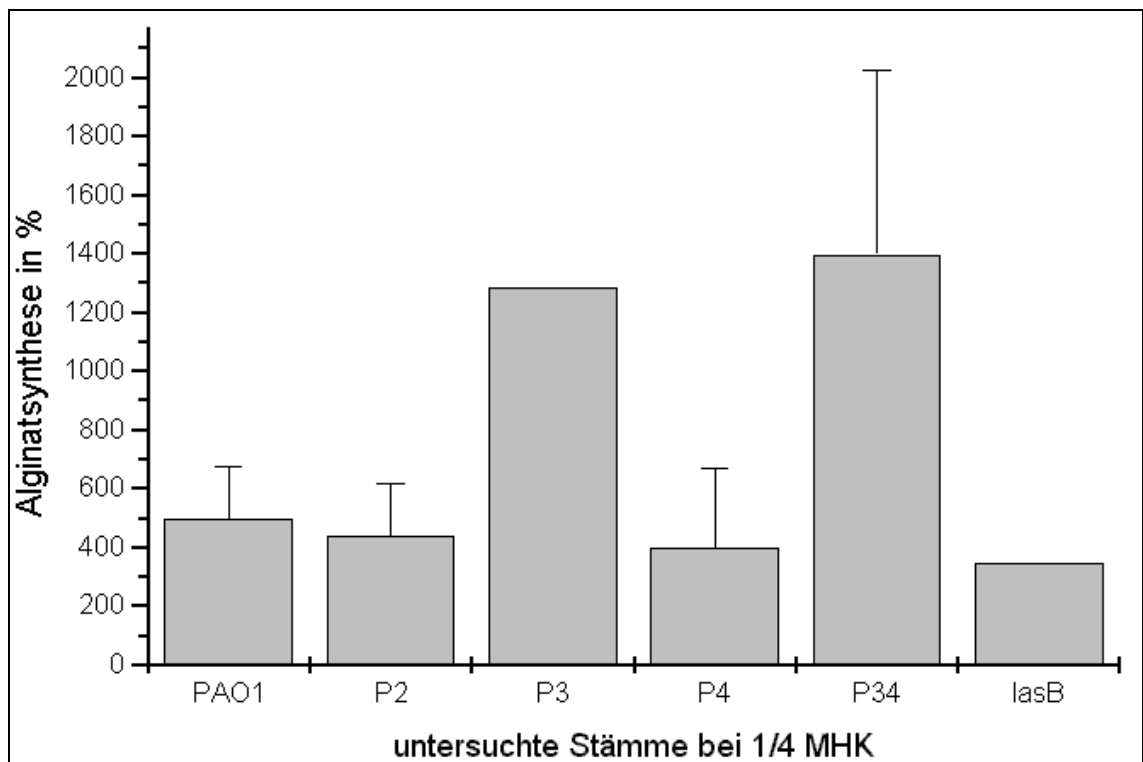


Abb. 3.9 Alginatsynthese bei $\frac{1}{4}$ MHK Ciprofloxacin (Kontrolle = 100%)

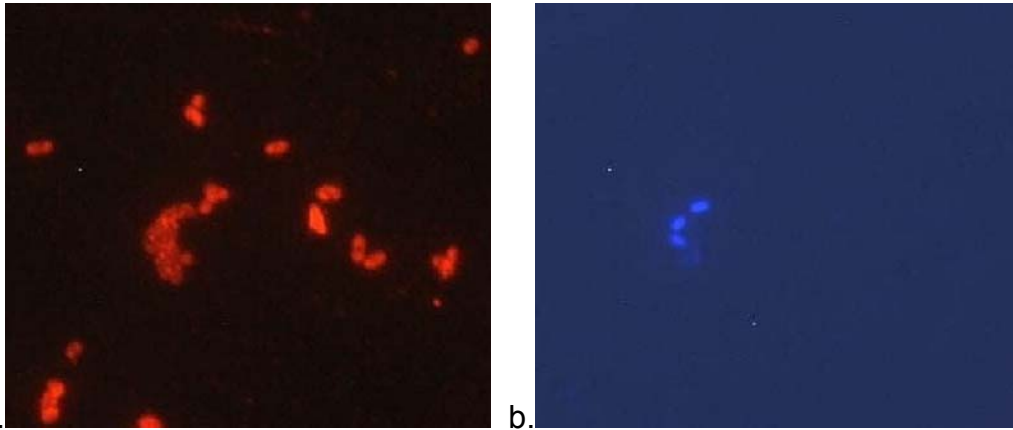


Abb. 3.10 Antibiotikumfreie Kontrolle von P2 a: Alginat- b: DNA-Nachweis

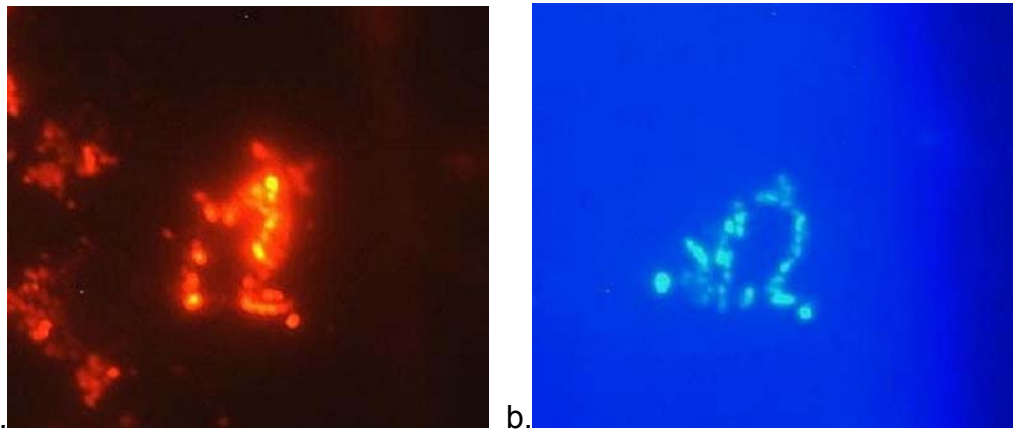


Abb.3.11 Wachstum von P2 bei $\frac{1}{2}$ MHK Ciprofloxacin a: Alginat-
b: DNA-Nachweis

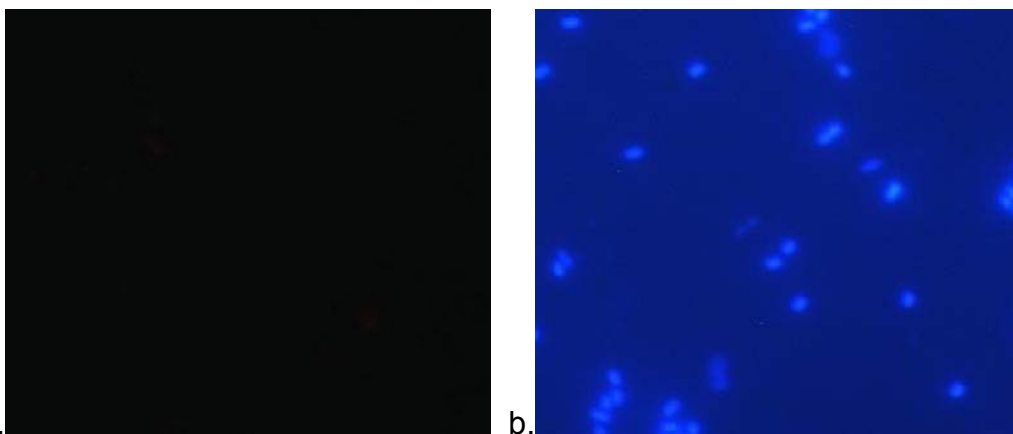


Abb. 3.12 Negativkontrolle a: IIFT ohne den ersten Antikörper b: DNA-Nachweis

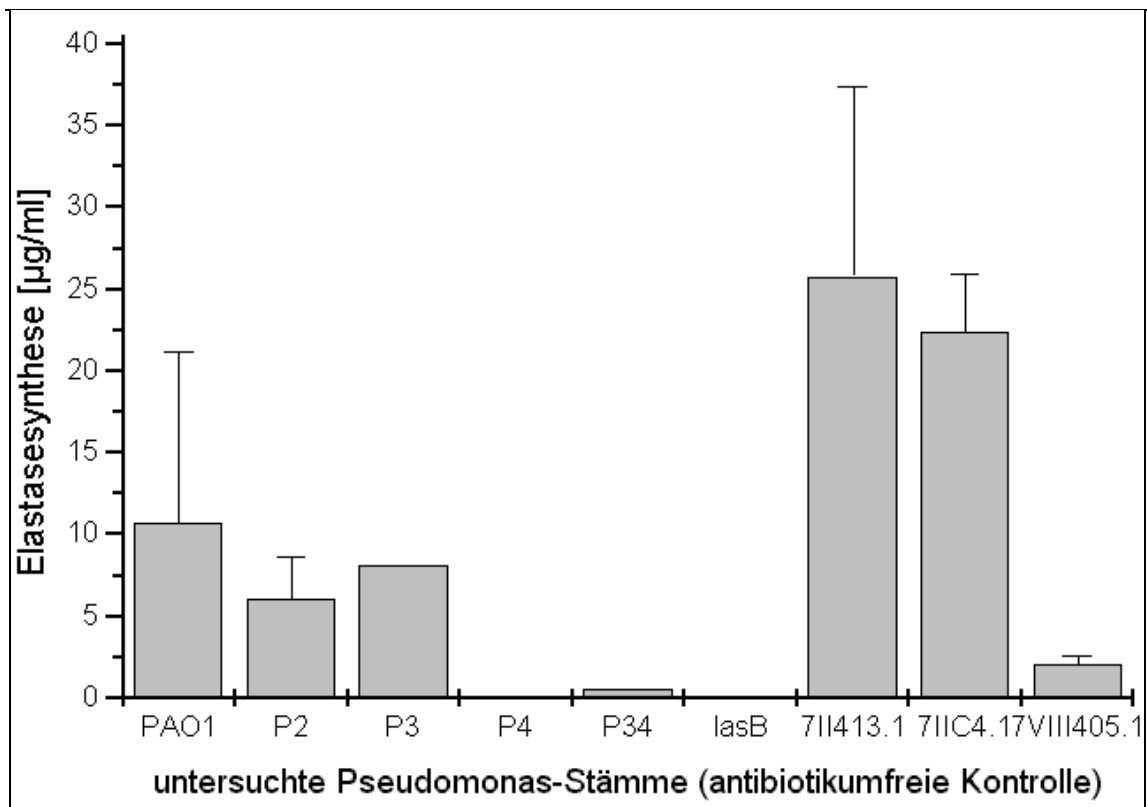


Abb. 3.13 Mittelwerte und Standardabweichungen der Elastasesynthese der untersuchten Stämme

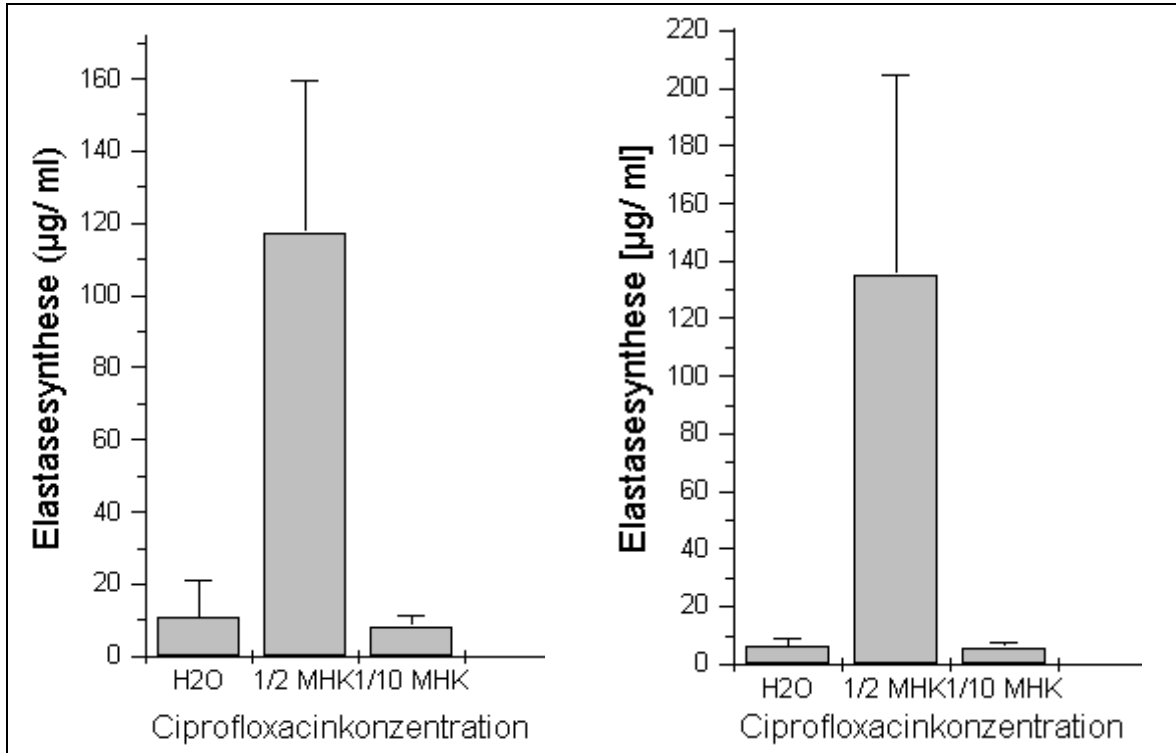


Abb. 3.14 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Elastasesynthese von PAO1

Abb. 3.15 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Elastasesynthese von P2

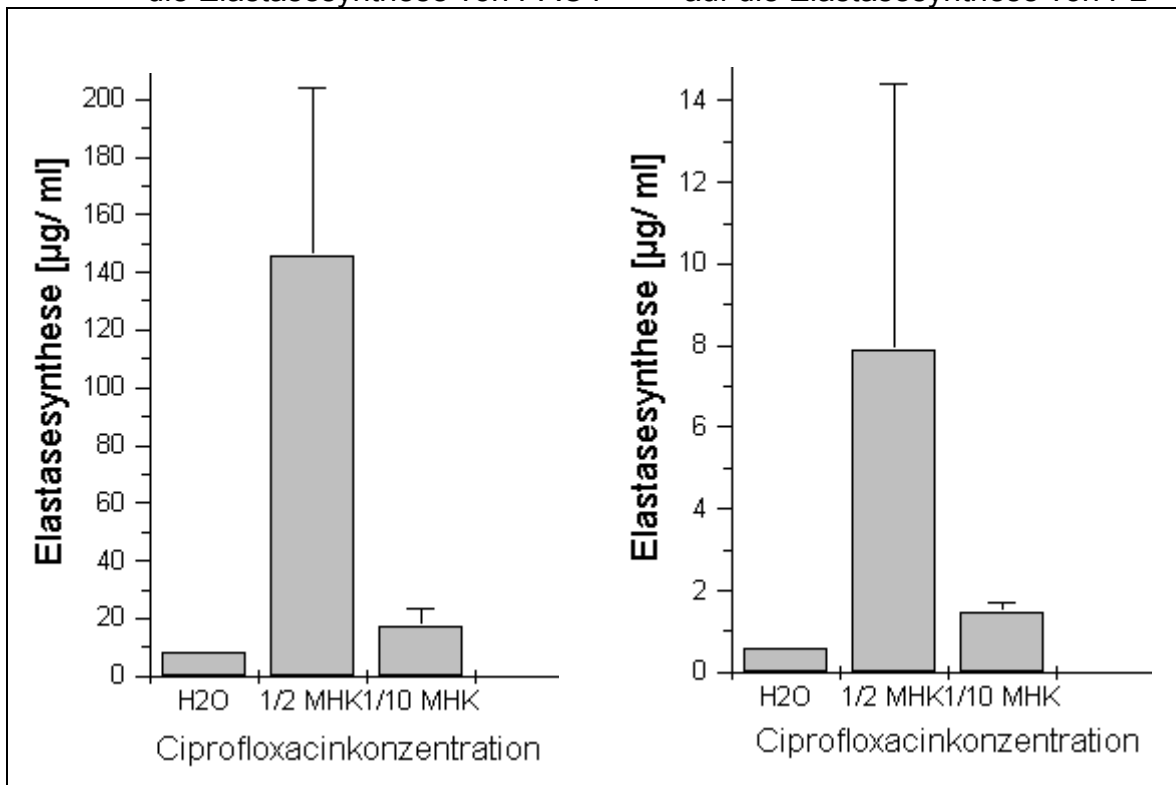


Abb. 3.16 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Elastasesynthese von P3

Abb. 3.17 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Elastasesynthese von P34

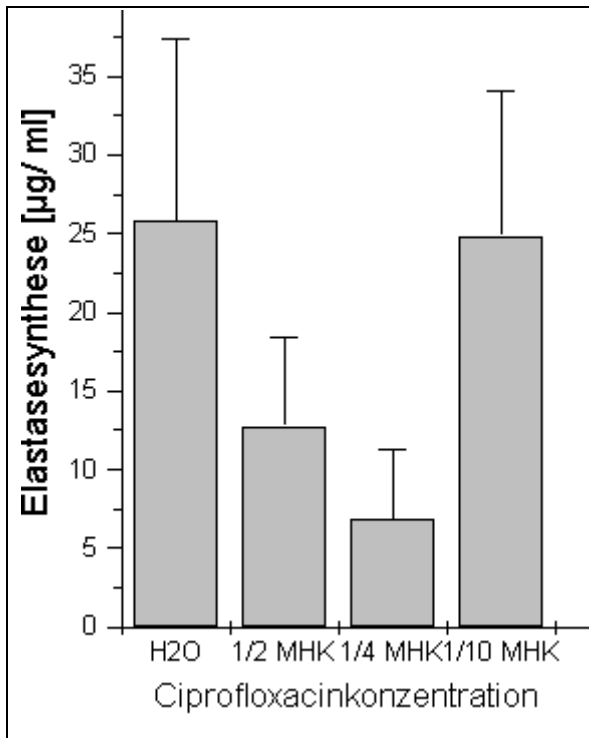


Abb. 3.18 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Elastasesynthese von 7II413.1

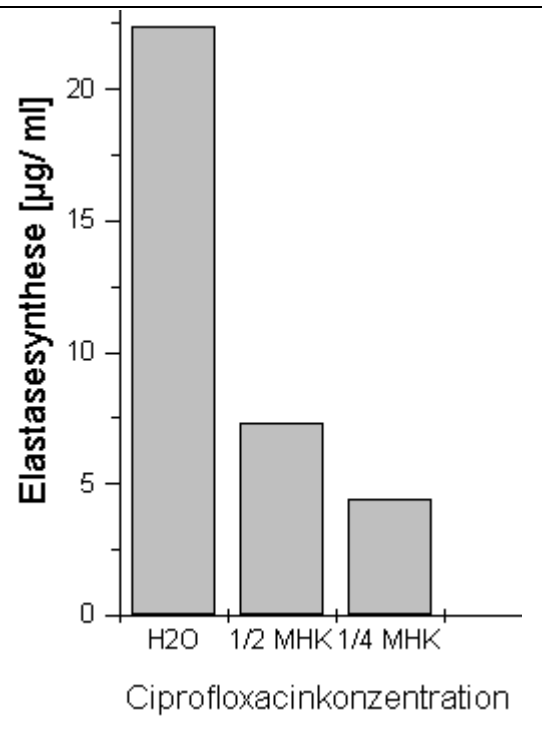


Abb. 3.19 Einfluss von Ciprofloxacin die Elastasesynthese von 7IIC4.1

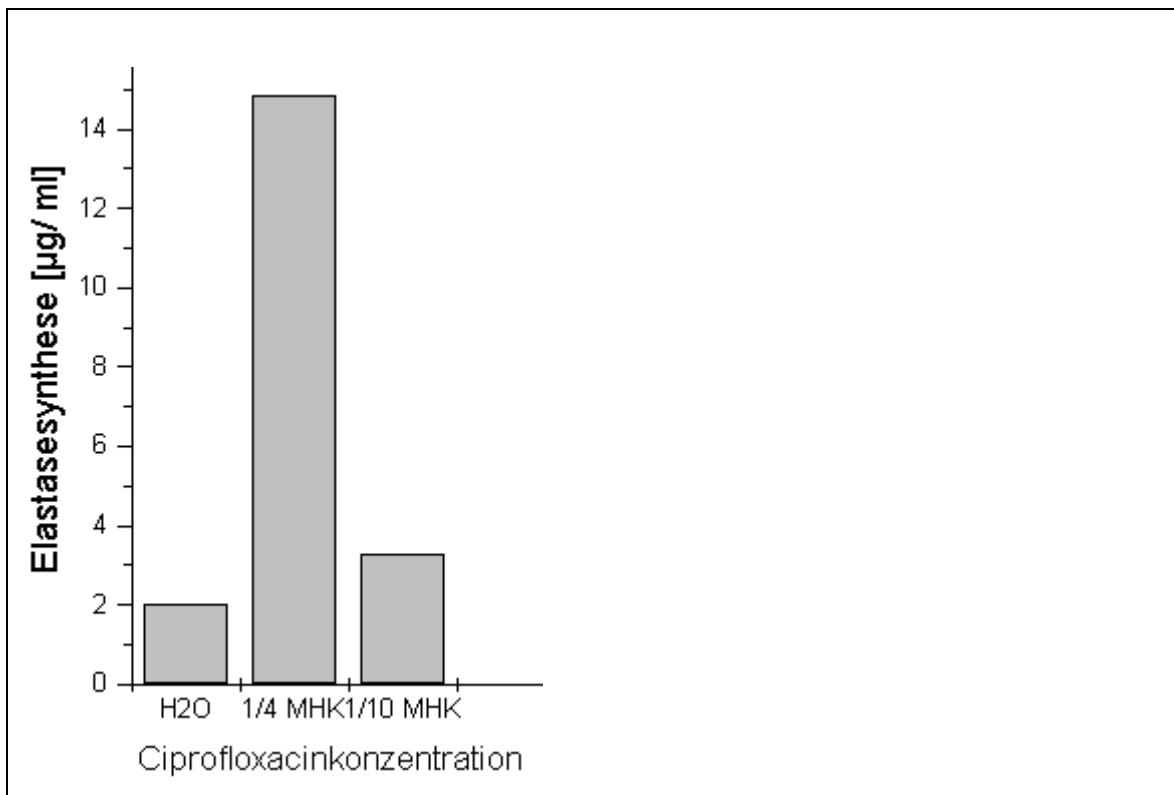


Abb. 3.20 Einfluss von Ciprofloxacin auf Elastasesynthese von 7VII405.1

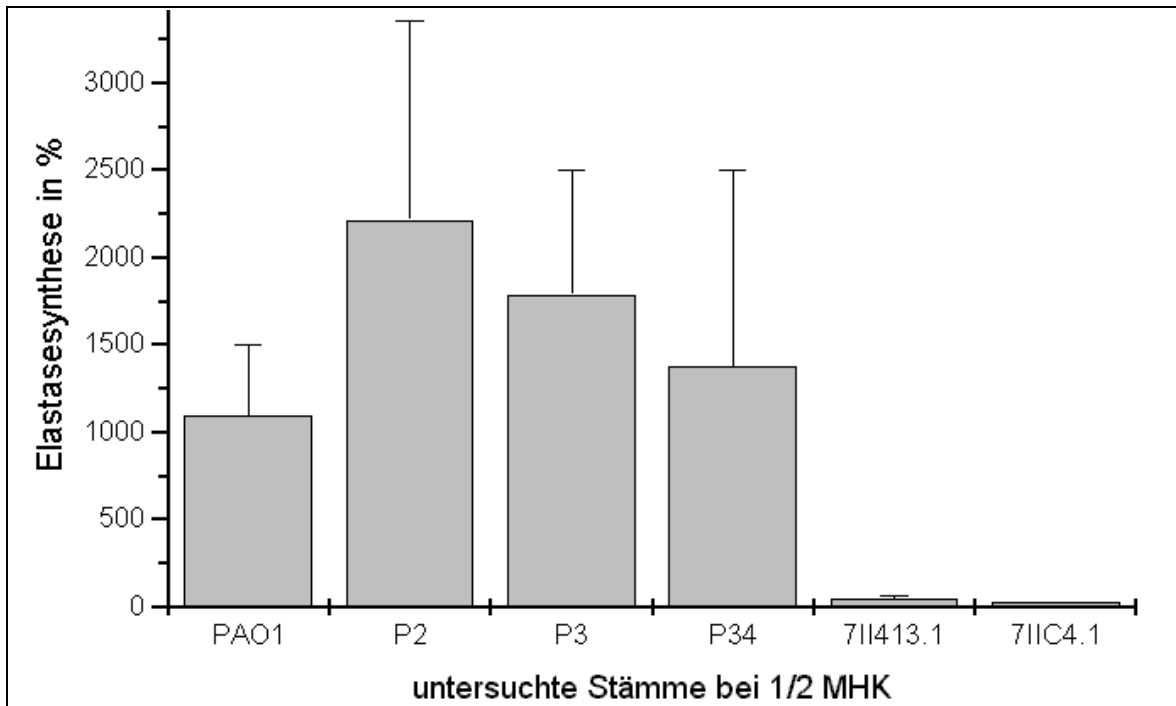


Abb. 3.21. Elastasesynthese bei 1/2 MHK Ciprofloxacin (Kontrolle = 100%)

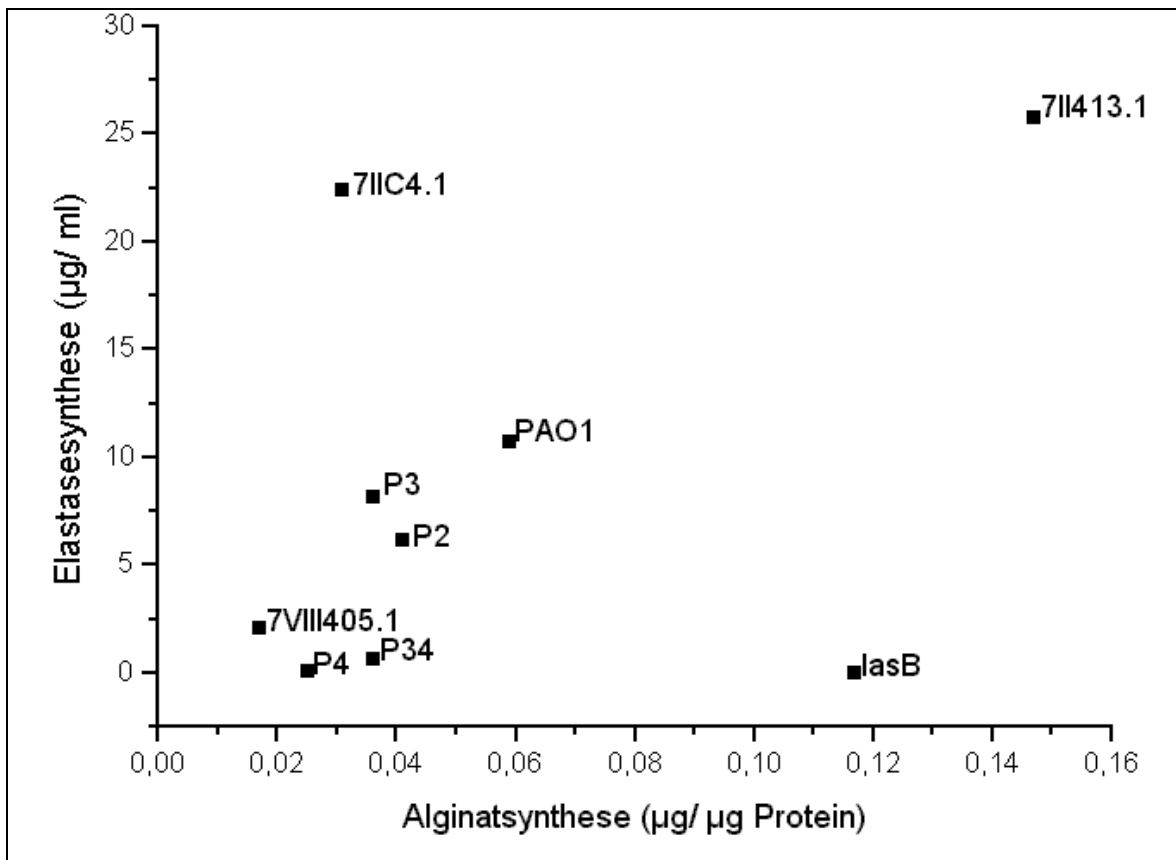


Abb. 3.22 Vergleich der Elastase- mit der Alginatsynthese der untersuchten Stämme ohne Zusatz von Ciprofloxacin

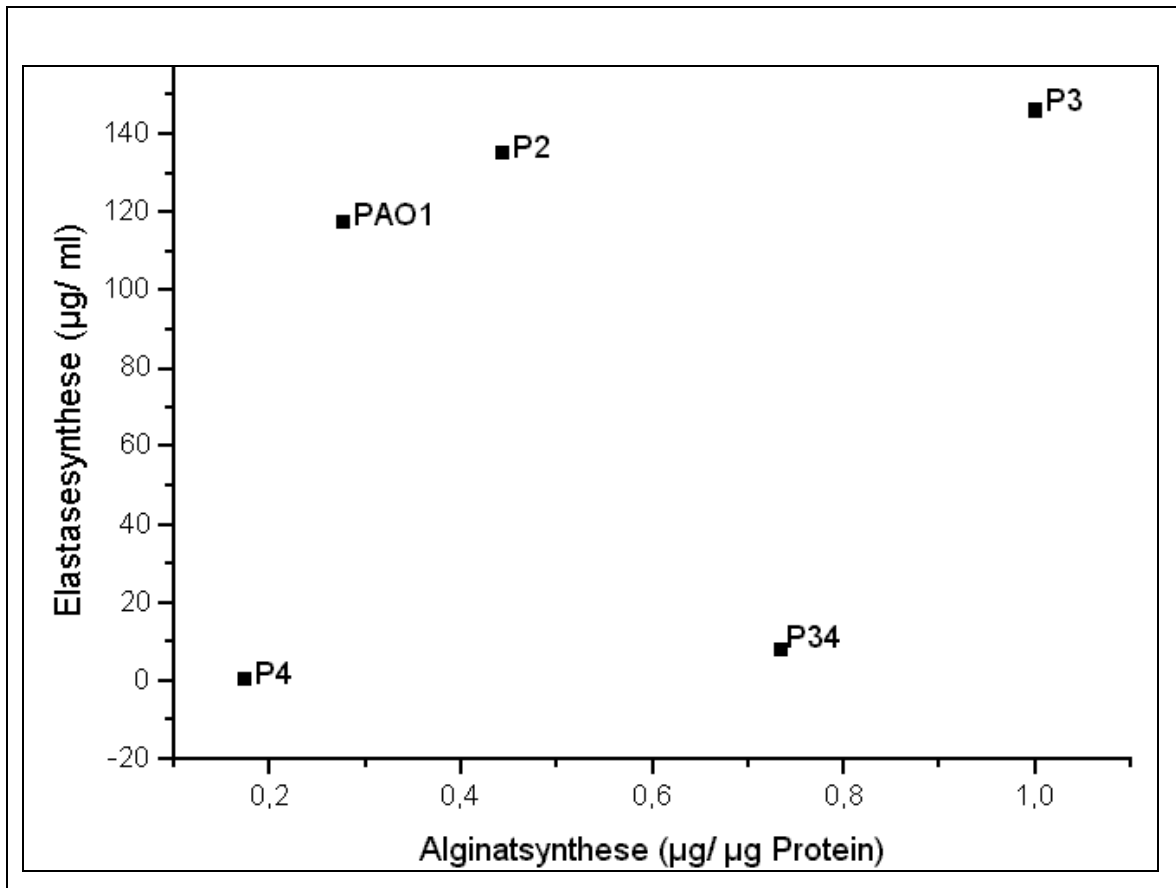


Abb. 3.23 Vergleich der Elastase- mit der Alginatsynthese der untersuchten Stämme bei ½ MHK Ciprofloxacin

4. Diskussion

4.1 Regulation der Virulenzfaktoren Alginat und Elastase von *P. aeruginosa*

Das Ausmaß der Alginatsynthese ist keine konstante Größe, sondern variiert je nach Stamm, auch kann der gleiche Stamm bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Es sind verschiedene Stimuli der Alginatsynthese bekannt. So konnten Worlitzsch et al. zeigen, dass anaerobe Wachstumsbedingungen zu einer gesteigerten Alginatsynthese führen [53]. Deretic et al. konnten einen alginatinduzierenden Effekt von erhöhten NaCl-Konzentrationen auf *P. aeruginosa* nachweisen. Kalai et al. fanden, dass H₂O₂ als toxisches Sauerstoffradikal, wie es von Neutrophilen Granulozyten zur Abwehr bakterieller Infektionen freigesetzt wird, ebenfalls die Alginatsynthese induziert [8] [33]. Das algD-Genprodukt nimmt eine Schlüsselstellung in der Alginatsynthese ein. Die Expression von algD lässt sich durch NaCl steigern, wenn gleichzeitig eine Mutation in einem muc-Genort (muc-2) vorliegt. Phänotypisch ist dieser Stamm mukoid. Liegt eine Mutation in einem anderen Genort (muc-23) vor, so führt dies zur einer verminderten algD Expression und damit zu einer reduzierten Alginatsynthese. Die Expression von algD wird von dem Genprodukt von algR reguliert. Dieses Genprodukt ist homolog zu anderen Regulatormolekülen, welche eine Reihe von Genen aktivieren, die auf bestimmte Umweltreize reagieren [8]. Die Elastasesynthese von *P. aeruginosa* wird von verschiedenen Systemen reguliert. Whiteley et al. und Pearson et al. konnten zeigen, dass sowohl das LasR/LasI-, als auch das RhIR/RhII-System die Expression von lasB und damit die Elastasesynthese steigern [36] [40] [51]. Pesci et al. konnten zeigen, dass PQS die Expression des lasB-lacZ-Fusionsgen induziert. Da lacZ für β -Galactosidase kodiert, konnte über dessen Enzymaktivität indirekt auf die Expression von lasB und damit der Elastase geschlossen werden [41].

In dieser Arbeit wurde die Alginate- und die Elastasesynthese verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme bestimmt. Ein Teil dieser Stämme waren Wildtypen, andere wiesen Defekte in der Elastasesynthese oder im Quorum Sensing System auf. Die Alginate- und die Elastasesynthese wurde miteinander verglichen und auf einen Einfluss dieser beiden Virulenzfaktoren, sowie die Auswirkungen eines defekten Quorum Sensing Systems hin untersucht. Weiter wurde ein Teil dieser Stämme bei subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen kultiviert, um den Einfluss dieses Antibiotikums auf die Regulation dieser Virulenzfaktoren zu untersuchen.

4.2 Regulation der Alginate synthese von *P. aeruginosa*

Der Wildtyp 7II413.1 zeigte eine ausgeprägte Alginateproduktion bei mukoidem Phänotyp. Auch der elastasenegative Stamm lasB zeigte eine starke Alginate synthese, so dass auch hier von einem mukoidem Phänotyp gesprochen werden kann. Die Stämme PAO1, P2, P3, P34, 7IIC4.1 und 7VIII405.1 zeigten eine moderate Alginateproduktion. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich die Alginate synthese des Elternstammes P2 nur unwesentlich von der der RhIR-negativen Mutante P34 unterscheidet, RhIR scheint also keinen Einfluss auf die Alginate synthese zu haben. Der LasR –negative Stamm P4 zeigte eine niedrigere Alginateproduktion im Vergleich zum Elternstamm P2, ein Einfluss ist also denkbar, aber allenfalls gering.

4.3 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Alginate synthese von *P. aeruginosa*

Unter Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen konnte bei allen untersuchten Stämmen eine Zunahme der Alginate synthese festgestellt werden. Die Induktion war konzentrationsabhängig, bei niedrigeren Antibiotikumkonzentrationen erreichte sie wieder den Ausgangswert. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei Stämmen, die ohne Antibiotikum relativ wenig Alginate produ-

zierten, so bei P2, P3 und P34. Der Stamm P4 zeigte ebenfalls nur eine moderate Alginatsynthese, diese konnte durch das Antibiotikum jedoch nicht so stark gesteigert werden wie bei dem Elternstamm P2, möglicherweise als Folge des LasR – Defektes. Auch der Stamm lasB reagierte mit einer nur geringen Steigerung der Alginatsynthese. Da der Stamm jedoch schon relativ mukoid war, ist die vergleichsweise geringe Zunahme möglicherweise mit dem Erreichen einer maximalen Syntheserate zu erklären. Auch bei dem Stamm PAO1 konnte eine deutliche Induktion der Alginatsynthese gefunden werden, allerdings war diese nicht so ausgeprägt, wie von Dossinger [11] beschrieben. Die Alginatsynthese war bei allen untersuchten Stämmen deutlich ausgeprägter, als die von Dossinger bei Gentamicin und Ceftazidim gemessenen Werte [11], der Effekt lässt sich also mit dem Chinolon Ciprofloxacin, nicht aber mit dem Aminoglykosid Gentamicin oder dem Cephalosporin Ceftazidim erzeugen.

Das Auftreten von mukoiden Phänotypen könnte durch den Selektionsdruck, den das Antibiotikum ausübt, erklärt werden, da bekannt ist, dass Antibiotika die Entstehung resistenter Stämme durch Selektion bewirken [47]. Da das Alginat eine Diffusionsbarriere für Antibiotika darstellt, wäre eine ausgeprägte Polysaccharidhülle ein Selektionsvorteil. Andererseits konnte Dossinger [11] zeigen, dass andere Antibiotika, wie Aminoglykoside und Cephalosporine nur geringen Einfluss auf die Alginatsynthese haben, Ichimiya et al. [22] konnten eine Reduktion der Alginatbildung durch Makrolide feststellen [12] [54]. Da die konzentrationsabhängige Alginatinduktion bei Ciprofloxacin besonders ausgeprägt war, sprechen diese Ergebnisse für eine biologische Aktivität als Stressfaktor, wie H₂O₂ oder anaerobes Milieu, oder möglicherweise in Form einer Interaktion mit dem Rezeptor für das PQS [41].

4.4 Regulation der Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Der Stamm P4 synthetisiert den Autoinducer LasI, es fehlt jedoch der entsprechende Transkriptionsfaktor LasR, daher verfügt dieser Stamm über kein funk

tionsfähiges LasR/LasI-System. Es konnte mittels RIA nur eine sehr geringe Elastasesynthese nachgewiesen werden. Ebenfalls eine verminderte Elastasesynthese zeigte der Stamm P34, diese war jedoch höher, als die von P4. Insgesamt war die Syntheseleistung beider Stämme sehr viel geringer, als die des Elternstammes P2. Der Stamm P34 synthetisiert den Autoinducer RhII, es fehlt der Transkriptionsfaktor RhIR, das LasR/ LasI-System ist intakt. Diese Ergebnisse ergänzen die Arbeiten von Pearson et al. [40]. Sie konnten zeigen, dass der Ausfall des Signalmoleküls LasI zu einem Abfall der Elastasesynthese führt, ebenso das Fehlen von RhII. Der Ausfall von LasI zeigte sich dabei als schwerwiegender. Es ist also für ein intaktes Autoinducersystem und damit einer uneingeschränkten Elastasesynthese sowohl der Transkriptionsfaktor, als auch das Signalmolekül notwendig. Im Gegensatz zu Pearson et al. wurde nicht die Enzymaktivität der Elastase mittels Kongo-Rot-Assay bestimmt, sondern die Elastase durch RIA quantifiziert. Diese Methode ist sehr viel spezifischer und sensitiver, da auch andere Proteasen von *P. aeruginosa* Elastin spalten und damit bei einem Kongo-Rot-Assay, der auf Elastinspaltung basiert, falsch positive Ergebnisse liefern. So konnten Wolz et al. zeigen, dass der elastasenegative Stamm lasB aufgrund der alkalischen Protease trotzdem noch eine elastolytische Aktivität aufweist [52].

4.5 Einfluss subinhibitorischer Ciprofloxacinkonzentrationen auf die Elastasesynthese von *P. aeruginosa*

Unter subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen zeigten die Stämme 7II413.1 und 7IIC4.1 einen starken Abfall der Elastasesynthese, die mit abnehmender Antibiotikumkonzentration im Nährmedium wieder anstieg. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Dalhoff et al. und Grimwood et al. [7] [16]. Die Syntheseraten des Stammes P4 war weiterhin so niedrig, dass eine Beurteilung der gemessenen Werte nicht möglich war, der Stamm P34 zeigte eine Induktion der Elastasesynthese, die Werte des Elternstammes P2 wurden jedoch nicht erreicht. Der Ausfall von LasR oder RhIR war also durch das Antibiotikum nicht

kompensierbar. Die Stämme PAO1, P2, P3, und 7VIII405.1 zeigten eine vermehrte Elastasesynthese, es kam zu einer Induktion. Die untersuchten Stämme reagierten also nicht einheitlich auf das Antibiotikum. Grimwood et al. konnten zeigen, dass bei einem mukoiden Stamm die Elastasesynthese nicht durch Ciprofloxacin reduziert wurde, diese Tatsache lässt darauf schließen, dass der Einfluss des Antibiotikums auf die Elastaseproduktion stammabhängig ist [17]. Im Gegensatz zu Grimwood et al. wurde auch hier nicht der Kongo-Rot-Assay, sondern der spezifischere und sensitivere RIA verwendet.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Elastaseproduktion mag sein, dass manche Stämme auf Umweltstress, in diesem Fall das Antibiotikum, mit einer vermehrten Elastasesynthese reagieren, andere jedoch nicht. Da das PQS chemisch den Chinolonantibiotika verwandt ist, wäre aufgrund dieser Ergebnisse ein partieller Agonismus des Ciprofloxacins denkbar, das bei geringen PQS-Konzentrationen die noch freien Rezeptoren besetzt, dessen Wirkungen teilweise imitiert und so zu einer Elastaseinduktion führt. Bei hohen PQS-Spiegeln konkurriert es jedoch mit diesem um das Bindemolekül und verdrängt es, besitzt aber nur ein Teil dessen biologischer Wirksamkeit und führt daher zu einem Abfall der Synthese. So zeigten die Stämme mit einer hohen Elastasesynthese einen Abfall des Enzyms, während solche mit niedriger Produktion mit einer Induktion reagierten. Das Phänomen des partiellen Agonismus ist auch bei anderen Pharmaka bekannt, so besitzt der β -Blocker Pindolol eine gewisse adrenerge Wirkung, die als intrinsic sympathomimetic activity (ISA) bezeichnet wird, die sehr viel stärkere Wirkung der physiologischen Liganden der β -Rezeptoren Adrenalin und Noradrenalin wird jedoch blockiert [32].

Für die von Pesci et al. festgestellte Induktion von lasB-lacZ durch synthetisches PQS bei einer Konzentration von 50 μ M konnte kein Korrelat mittels RIA für Elastase gefunden werden. Eine Erklärung wären die physikochemischen Eigenschaften von PQS, welches sehr lipophil ist und daher möglicherweise im Nährmedium TSB nicht ausreichend löslich war.

4.6 Regulation von Alginat im Vergleich zur Elastasesynthese

Der elastasenegative Stamm lasB zeigte eine starke Alginatproduktion, so dass von einem mukoiden Phänotyp gesprochen werden kann, Elastase konnte mittels RIA nicht nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mohr et al. [35], die bei vier von fünf mukoiden Stämmen eine nur geringe Aktivität des lasB –Promotors fanden, die vier Stämme zeigten also eine ausgeprägte Alginatsynthese, bei gleichzeitig geringer Elastasesynthese. Andererseits zeigten die nicht-mukoiden Phänotypen der Stämme keine verstärkte Elastasesynthese. Es wurde eine gegenläufige Koregulation von Elastase und Alginat parallel oder vor dem alginatkodierenden Gen vermutet. Die LasR- und RhlR- negativen Mutanten P4 und P34 zeigten ebenfalls eine geringe Elastasesynthese, aber auch nur eine moderate Alginatproduktion. Der Wildtyp 7II413.1 zeigte einen mukoiden Phänotyp bei gleichzeitig ausgeprägter Elastasesynthese. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kamath et al., die zeigen konnten, dass eine sehr ausgeprägte Produktion von Elastase die Alginatsynthese sowohl in mukoiden, als auch in nicht-mukoiden Stämmen stimuliert [24]. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Alginatsynthese der Stämme PAO1, P2, P3 und P34 durch Ciprofloxacin nicht zu einem Abfall der Elastasesynthese führt. Ciprofloxacin induziert bei diesen Stämmen gleichzeitig die Elastasesynthese. Der Stamm P4 zeigte ebenfalls eine Induktion der Alginatsynthese auf Ciprofloxacin, die Elastasesynthese blieb weiterhin gering. Diese Ergebnisse lassen keinen Zusammenhang im Sinne einer gegenläufigen Koregulation von Alginat- und Elastasesynthese, wie von Mohr et al. vermutet, erkennen. Da bekannt ist, dass algR, welches die Alginatsynthese kontrolliert, anderen Molekülen homolog ist, welche die Reaktion auf Umweltstress regulieren und Ciprofloxacin bei den Stämmen PAO1, P2, P3 und P34 gleichsinnig eine Induktion der Virulenzfaktoren Alginat und Elastase bewirkt, ist zu vermuten, dass es übergeordnet als Stressfaktor auf beide Systeme wirkt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass keine inverse Koregulation der Virulenzfaktoren Alginate und Elastase bei den untersuchten Stämmen vorliegt. Das bedeutet, dass eine derartige Regulation stammabhängig ist, oder dass diese beiden Virulenzfaktoren grundsätzlich unabhängig voneinander reguliert werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass Ciprofloxacin die Alginate-synthese von *P. aeruginosa* induzieren kann. Dabei hat das Autoinducersystem kaum (LasR) oder gar keinen Einfluss (RhIR) auf dessen Synthese und dessen Induzierbarkeit durch das Antibiotikum. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Ciprofloxacin die Elastasesynthese bei manchen Stämmen reduzieren, bei anderen auch induzieren kann. Die Stämme P4 und P34, welche ein defektes Autoinducersystem besitzen, zeigten keine wesentliche Änderung der Elastaseproduktion, während deren Elternstamm P2 mit einer deutlich gesteigerten Elastasesynthese auf Ciprofloxacin reagierte. Das bedeutet, dass die Struktur, auf die Ciprofloxacin einwirkt in der Signaltransduktionskette für die Elastaseexpression den Autoinducern vorangeschaltet ist. Bei der chronischen Infektion von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* sind weitere Faktoren bekannt, die die Alginate-synthese induzieren, wie das H₂O₂ Neutrophiler Granulozyten oder das anaerobe Milieu im Mukus [33] [53]. Daher besteht unter Umständen ein additiver oder synergistischer Effekt dieser Faktoren mit subinhibitorischem Ciprofloxacin. Hinsichtlich der Therapie einer Infektion durch *P. aeruginosa* mit Ciprofloxacin könnte sich neben der bakteriziden Wirkung eine mögliche Reduktion des Virulenzfaktors Elastase bei subinhibitorischer Antibiotikumkonzentration als vorteilhaft erweisen. Allerdings ist eine derartige Wirkung nicht bei allen Stämmen zu erwarten. Weiterhin könnte eine zusätzliche Induktion des Virulenzfaktors Alginate durch Ciprofloxacin die weitere Therapie der Infektion erschweren, wenn es nicht gelingt, den Erreger zu eliminieren. Diese Ergebnisse beziehen sich auf eine relativ geringe Anzahl von Stämmen. Daher werden weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Stämmen, unter anderem auch mit zusätzlich veränderten Bedingungen, wie etwa anaerobes Milieu notwendig sein.

5. Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa besitzt ein Quorum Sensing System, welches neben dem bakteriellen Wachstum auch die Produktion von Virulenzfaktoren wie Alginate und Elastase reguliert. Das Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) induziert ebenfalls die Expression von Elastase. Da PQS der Antibiotikaklasse der Chinolone chemisch nahe verwandt ist, können diese Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen, wie sie bei der Therapie von chronischen Infektionen zu finden sind, möglicherweise analog dem PQS die Expression von Virulenzfaktoren modifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die Expression von Alginate und Elastase von *P. aeruginosa* gegenläufig oder gleichsinnig reguliert, ob subinhibitorische Konzentrationen des Chinolons Ciprofloxacin deren Expression induzieren und ob das Autoinducersystem dabei eine Rolle spielt. Labor- und Patientenisolat von *P. aeruginosa* wurden mit und ohne Ciprofloxacin in subinhibitorischer Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurden Mutanten mit defektem Autoinducersystem eingesetzt. Die Bestimmung der Alginatkonzentration erfolgte biochemisch mit Hilfe des Carbazol-Assays sowie immunologisch mit einem Alginate-Antikörper. Die Elastasekonzentrationen wurden radioimmunologisch ermittelt. Die Alginateproduktion aller untersuchten Stämme wurde unter subinhibitorischem Ciprofloxacin induziert. Der Defekt im Autoinducersystem äußerte sich lediglich in einer leicht reduzierten Alginatsynthese. Der Einfluss von subinhibitorischem Ciprofloxacin auf die Elastasekonzentrationen war uneinheitlich: bei vier Stämmen wurde die Elastase hoch-, und bei zwei weiteren Stämmen herunterreguliert. Die Mutanten konnten nur geringfügige Mengen an Elastase produzieren. Eine mit der erhöhten Expression von Elastase durch PQS vergleichbare Induktion durch subinhibitorisches Ciprofloxacin konnte nur bei einem Teil der verwendeten Stämme nachgewiesen werden. Eine vermehrte Alginateproduktion dagegen wurde bei allen Stämmen erreicht. Damit konnte belegt werden, dass Alginate und Elastase nicht gegenläufig koreguliert werden und dass Ciprofloxacin nur teilweise analoge

Auswirkungen wie PQS besitzt. Ein Defekt im Autoinducersystem lässt sich nicht dadurch kompensieren. Die Struktur, auf welche Ciprofloxacin einwirkt ist also den Autoinducern vorangeschaltet. Da bei der chronischen Infektion von CF-Patienten durch *P. aeruginosa* verschiedene Faktoren nachgewiesen werden konnten, welche die Alginatsynthese steigern und nach den Ergebnissen dieser Arbeit Ciprofloxacin ebenfalls dessen Synthese induzieren kann, sollten bei einer Therapie mit diesem Antibiotikum subinhibitorische Konzentrationen durch eine geeignete Dosis oder eine Kombinationstherapie vermieden werden.

A Tabellen

Tabellen I

Die Tabellen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die Einzelmessungen der Alginatbestimmung mittels Carbazolassay, weiterhin sind die Ciprofloxacinkonzentrationen, die der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Wachstum auf PIA entsprechen für die einzelnen Stämme angegeben.

Tabelle I.1. MHK- Bestimmung der untersuchten Stämme auf PIA
nach zwei Tagen Bebrütung:

Stamm:	Ciprofloxacin µg/ml der MHK
PAO1	1,56
P2	0,78
P3	3,12
P4	1,56
P34	0,78
las B	6,25

Tabelle I. 2. Mittelwerte und Standardabweichungen der Alginatbestimmung
mittels Carbazolassay nach zwei Tagen Bebrütung:

Stamm MHK	n	<u>Alginatsynthese¹</u>									
		H ₂ O		½ MHK		¼ MHK		1/8 MHK		1/16	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
PAO1	3	0,059±0,038	0,277±0,178	0,295±0,108	0,116±0,028	0,060±0,011					
P2	3	0,041±0,019	0,443±0,174	0,179±0,074	0,089±0,041						
P3	2	0,036	1,000	0,463	0,482	0,100					
P4	4	0,025±0,009	0,174±0,070	0,099±0,069	0,051±0,016	0,048±0,022					
P34	4	0,036±0,018	0,734±0,477	0,505±0,226	0,117±0,087						
LasB	2	0,117	0,373	0,405	0,091	0,078					

¹ µg Alginat / µg Protein; Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

Tabelle I.3.

Dargestellt ist die Ciprofloxacinkonzentration in µg/ml, die Absorption bei 530 nm des Carbazol- Assays, die Absorption bei 562 nm des Pierce- Assays 1:1 und 1:10 verdünnt, da bei hoher Proteinkonzentration die Messwerte ungenau wurden, die um den Leerwert korrigierte Absorption des Carbazol- Assays, die absolute Alginatkonzentration in µg/ml, die absolute Proteinkonzentration in µg/ml und den Quotienten Alginat/Protein. Die Alginatbestimmung erfolgte nach zwei Tagen Bebrütung.

Stamm: las B

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm	OD 562 nm	Alginat kor. Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/Protein	
Leerwert	0,294					
0	0,96	1,172	0,666	310	1925	0,161
3,12	0,417	0,148	0,123	65	225	0,289
1,56	0,932	0,447	0,638	300	740	0,405
0,78	0,833	1,116	0,539	255	1825	0,14
0,39	0,767	1,202	0,473	225	1975	0,114
0,18	0,993	1,208	0,699	330	1975	0,167
0,09	0,944	1,544	0,65	305	2550	0,12
Leerwert	0,462					
0	0,854	1,512	0,392	180	2475	0,073
3,12	0,81	0,22	0,348	160	350	0,457
1,56	0,71	2,175	0,248	120	3575	0,034
0,78	0,588	0,976	0,126	65	1600	0,041
0,39	0,664	1,462	0,202	100	2400	0,042
0,18	0,462	1,535				
0,09	0,854	1,549	0,392	180	2550	0,051

¹ Ciprofloxacin

Stamm: PAO1

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor. µg/ml	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,095						
0	0,359	1,505	0,218	0,264	130	3500	0,037
0,78	0,28	0,115	0,007	0,185	90	175	0,514
0,39	0,446	0,229	0,021	0,351	160	360	0,444
0,18	0,585	1,189	0,077	0,49	220	1400	0,157
0,09	0,291	1,491	0,128	0,196	95	2000	0,048
Leerwert	0,171						
0	0,325	1,464	0,197	0,154	75	3200	0,023
0,78	0,251	0,112	0,01	0,08	40	180	0,222
0,39	0,431	0,391	0,041	0,26	130	650	0,2
0,18	0,503	1,046	0,098	0,332	155	1600	0,097
0,09	0,465	1,414	0,169	0,294	140	2600	0,054
Leerwert	0,123						
0	0,693	1,355	0,154	0,57	270	2500	0,108
0,78	0,301	0,186	0,016	0,178	85	300	0,283
0,39	0,45	0,301	0,033	0,327	150	495	0,303
0,18	0,52	1,046	0,109	0,397	185	1750	0,106
0,09	0,479	1,395	0,144	0,356	170	2450	0,069
Leerwert	0,114						
0	0,533	1,559	0,178	0,419	200	2950	0,068
0,78	0,201	0,285	0,019	0,087	40	460	0,087
0,39	0,415	0,376	0,037	0,301	145	620	0,234
0,18	0,461	0,994	0,1	0,347	165	1600	0,103
0,09	0,492	1,276	0,155	0,378	175	2500	0,07

¹ Ciprofloxacin

Stamm: P2

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,301						
0	0,771	1,805	0,232	0,47	225	3800	0,059
0,39	0,53	0,204	0,035	0,229	110	330	0,333
0,18	0,841	0,861	0,107	0,54	255	1410	0,181
0,09	0,826	1,28	0,212	0,525	250	3500	0,071
Leerwert	0,201						
0	0,371	1,592	0,238	0,16	80	3800	0,021
0,39	0,396	0,169	0,012	0,195	95	270	0,352
0,18	0,509	0,843	0,086	0,308	145	1385	0,105
0,09	0,56	1,682	0,174	0,359	170	2850	0,06
Leerwert	0,167						
0	0,485	1,528	0,233	0,318	150	3700	0,041
0,39	0,355	0,085	0,01	0,188	90	140	0,643
0,18	0,748	0,663	0,064	0,581	270	1070	0,252
0,09	0,889	1,163	0,149	0,722	340	2500	0,136

¹ Ciprofloxacin

Stamm P3

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,182						
0	0,432	1,41	0,195	0,25	115	3200	0,036
1,56	0,186	0,042	0,002				
0,78	0,244	0,068	0,006	0,062	30	100	0,3
0,39	0,422	0,201	0,019	0,24	115	325	0,354
0,18	0,547	0,905	0,117	0,365	170	2000	0,085
0,09	0,551	1,238	0,182	0,369	170	3000	0,057

¹ Ciprofloxacin

Stamm P3

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,172						
0	0,394	1,444	0,188	0,222	105	3000	0,035
1,56	0,27	0,039	0,001	0,098	50	50	1
0,78	0,277	0,05	0,004	0,105	50	80	0,625
0,39	0,468	0,143	0,016	0,296	140	230	0,609
0,18	0,495	0,776	0,094	0,323	150	1300	0,115
0,09	0,585	1,199	0,147	0,413	195	2450	0,08

¹ Ciprofloxacin

Stamm: P4

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,119						
0	0,366	1,572	0,233	0,247	115	3700	0,031
0,78	0,395	0,334	0,039	0,276	135	520	0,25
0,39	0,393	0,984	0,132	0,274	135	2000	0,068
0,18	0,381	1,418	0,203	0,262	130	3250	0,04
0,09	0,398	1,463	0,227	0,279	135	3500	0,039
Leerwert	0,125						
0	0,322	1,636	0,25	0,197	95	4000	0,024
0,78	0,34	0,562	0,072	0,215	100	900	0,111
0,39	0,396	1,247	0,185	0,271	135	2900	0,047
0,18	0,397	1,418	0,21	0,272	135	3500	0,037
0,09	0,38	1,64	0,244	0,265	130	3900	0,033

¹ Ciprofloxacin

Stamm: P4

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,239						
0	0,448	1,261	0,178	0,209	100	3000	0,033
0,78	0,347	0,197	0,034	0,108	50	310	0,161
0,39	0,382	0,517	0,078	0,143	70	850	0,082
0,18	0,494	0,957	0,13	0,255	120	2100	0,057
0,09	0,735	1,25	0,179	0,496	240	3000	0,08
Leerwert	0,283						
0	0,347	1,351	0,182	0,064	35	3000	0,012
0,78	0,232	0,034	0,008	0	0		
0,39	0,472	0,286	0,036	0,189	90	450	0,2
0,18	0,628	0,937	0,144	0,345	160	2250	0,071
0,09	0,535	1,271	0,182	0,252	120	3000	0,04

¹ Ciprofloxacin

Stamm: P34

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,492						
0	0,595	1,538	0,203	0,103	50	3250	0,015
0,39	0,524	0,123	0,01	0,032	20	200	0,1
0,18	0,76	0,206	0,019	0,268	130	350	0,371
0,09	0,668	0,874	0,094	0,176	80	1425	0,056
Leerwert	0,346						
0	0,581	1,61	0,208	0,235	110	3250	0,034
0,39	0,509	0,074	0,006	0,163	80	125	0,64
0,18	0,535	0,212	0,021	0,189	90	350	0,257
0,09	0,45	0,888	0,099	0,104	50	1700	0,029

¹ Ciprofloxacin

Stamm: P34

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,255						
0	0,562	1,227	0,154	0,307	145	2500	0,058
0,39	0,567	0,072	0,014	0,312	145	125	1,16
0,18	0,695	0,178	0,02	0,44	205	300	0,683
0,09	0,889	0,848	0,093	0,634	300	1500	0,2
Leerwert	0,214						
0	0,433	1,384	0,168	0,219	100	2750	0,036
0,39	0,534	0,083	0,014	0,32	150	145	1,034
0,18	0,812	0,24	0,028	0,598	280	395	0,709
0,09	0,79	0,76	0,085	0,576	275	1500	0,183

¹ Ciprofloxacin

Stamm: 7II413.1

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,113						
0	0,285		0,03	0,172	88	500	0,176
0	0,291		0,29	0,178	90	500	0,18
0	0,273		0,044	0,16	60	700	0,086

Stamm: 7IIC4.1

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor.	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,113						
0	0,258		0,159	0,145	70	2510	0,028
0	0,247		0,151	0,134	65	2500	0,026
0	0,31		0,155	0,197	95	2510	0,038

¹ ohne Zusatz von Ciprofloxacin

Stamm: 7VIII405.1

Konzentration in µg/ml ¹	OD 530nm Alginat	OD 562 nm Protein 1:1	OD 562 nm Protein 1:10	Alginat kor. µg/ml	Alginat µg/ml	Protein µg/ml	Alginat/ Protein
Leerwert	0,113						
0	0,178		0,147	0,065	20	2480	0,008
0	0,227		0,154	0,114	55	2510	0,022
0	0,225		0,144	0,112	52	2470	0,021

¹ ohne Zusatz von Ciprofloxacin

Tabellen II

Intensitätsmessung der Fluoreszenz des IIFT auf Alginat (IE) nach zwei Tagen
Bebrütung mit und ohne Ciprofloxacin. Abkürzung: AB = Antibiotikum

Stamm: PAO1

ohne AB 1/2 MHK¹

85 86

108 140

88 129

90 96

112 155

96

Stamm:P2

ohne AB 1/2 MHK

47 103

93 89

65 101

71 103

97

Stamm:P4

ohne AB 1/2 MHK

83 147

82 126

86 130

84 106

110 95

90 122

76 111

84

¹ Minimale Hemmkonzentration (MHK) Ciprofloxacin

Tabellen III

Tabelle III.1. MHK - Bestimmung der untersuchten Stämme in TSB
nach 18 h Inkubation:

Stamm:	Ciprofloxacin µg/ml der MHK	Stamm:	Ciprofloxacin µg/ml der MHK
PAO1	0,09	P34	0,045
P2	0,045	7II413.1	0,78
P3	0,09	7IIC4.1	1,56
P4	0,09	7VIII405.1	1,56

Tabelle III.2. Mittelwerte und Standardabweichungen der
Elastasebestimmung mittels RIA:

Stamm	<u>Elastasesynthese</u> ¹											
	H ₂ O			½ MHK			¼ MHK			1/10 MHK		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
PAO1	10,73±10,4		4	117,5±42,1		4	30,50		2	8,333±3,06		3
P2	6,100±2,51		3	135,3±69,4		4	38,50		2	5,900±1,61		3
P3	8,150		2	146,0±58,1		3	117,5		2	17,63±6,09		3
P4	0,075±0,01		3	0,390±0,21		4	0,955		2	1,566±0,21		3
P34	0,575		2	7,925±6,50		4	2,700		2	1,500±0,20		3
7II413.1	25,80±11,6		3	12,80±5,56		3	6,900±4,41		3	24,87±9,20		3
7IIC4.1	22,40±3,56		3	7,350		2	4,450		2	-		
7VIII405.1	2,033±0,55		3	-			14,85		2	3,300		2

¹ µg Elastase / ml; Minimale Hemmkonzentration Ciprofloxacin (MHK),
Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Anzahl der Messungen (n)

Tabelle III.3.

Da die Bindungskapazität der Antikörper bei ca. 10 000 CPM abgesättigt war und der Leerwert je nach Messreihe zwischen 70 und 220 CPM lag, wurden die Proben so verdünnt, dass die Messwerte in diesem Bereich lagen. Dargestellt ist die Ciprofloxacin- konzentration in MHK (AB-Konz), die Zellzahl der unverdünnten Probe pro ml (CFU), die Verdünnungsstufe der Probe, die gemessene Aktivität in CPM, die um den Leerwert korrigierte Aktivität, die anhand des Referenzwertes ermittelte Elastasekonzentration in µg/ml und, um die Ergebnisse vergleichen zu können, die auf die gleiche Zellzahl von 10⁹ /ml umgerechnete Elastasekonzentration (µg Ela/ml x 10⁹ Zellen). Leerwert und Referenzwert wurden für jede Messreihe neu bestimmt, da die Aktivität gemäss dem radioaktiven Zerfall ständig abnahm. Die Bestimmung wurde nach 18 h Inkubation durchgeführt. Abkürzungen: Ela = Elastase; CPM = counts per minute;

Leerwert: 221 CPM Referenzwert: 0,01µg Ela/ml = 1904 CPM

Stamm:	Zusatz im Medium :	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
las B	H2O	3,6x10 ¹⁰	10 ⁻¹	529	308	0,016	< 0,001

Leerwert: 150 CPM Referenzwert: 0,01µg Ela/ml = 1640 CPM

Stamm:	Zusatz im Medium :	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
P3	H2O	1,1x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2101	1951	119	10,8
	50µM PQS	1,4x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	1922	1772	108	7,7
	50µM PQS	1,9x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2573	2423	148	7,8
	50µM PQS	1,5x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2380	2230	136	9,1
P4	H2O	1,4x10 ¹⁰	10 ⁻¹	4381	4231	0,258	0,018

Leerwert: 110 CPM Referenzwert: 0,01µg Ela/ml = 1110 CPM

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
PAO1	0	5,5x10 ⁹	10 ⁻³	3196	3081	27,6	5
	1/2 MHK ¹	2x10 ⁸	10 ⁻³	3547	3434	30,8	154
	1/2 MHK	4x10 ⁸	10 ⁻³	2363	2253	23	58
P2	0	1,6x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	1664	1554	139	8,7
	1/2 MHK	1,4x10 ⁸	10 ⁻³	3773	3663	33	236
	1/2 MHK	4x10 ⁸	10 ⁻³	3651	3441	31	78
P3	1/2 MHK	8x10 ⁸	10 ⁻⁴	1142	1032	93	116
P4	0	2x10 ⁹	10 ⁻¹	517	407	0,036	0,018
	1/2 MHK	3x10 ⁸	10 ⁻¹	1208	1098	0,099	0,33
P34	0	5,8x10 ⁹	10 ⁻²	2348	2233	2	0,35
	1/2 MHK	4x10 ⁸	10 ⁻²	820	710	0,64	1,6

¹ Minimale Hemmkonzentration (MHK) Ciprofloxacin

Leerwert: 80 CPM Referenzwert: 0,1µg Ela/ml = 7400 CPM

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
PAO1	0	3,3x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	6483	6403	860	26
	1/2 MHK ¹	3,1x10 ⁸	10 ⁻³	3199	3119	43	139
	1/2 MHK	4,1x10 ⁸	10 ⁻³	3728	3648	49	119
	1/4 MHK	4,6x10 ⁹	10 ⁻⁴	1389	1309	177	38
	1/4 MHK	3,6x10 ⁹	10 ⁻³	6319	6239	84	23

¹ Minimale Hemmkonzentration (MHK) Ciprofloxacin

Leerwert: 80 CPM Referenzwert: 0,1µg Ela/ml = 7400 CPM

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
P2	0	5,4x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2455	2375	321	5,9
	1/2 MHK ¹	2,6x10 ⁸	10 ⁻³	2364	2284	31	119
	1/2 MHK	2,5x10 ⁸	10 ⁻³	2071	1991	27	108
	1/4 MHK	3,4x10 ⁹	10 ⁻⁴	1255	1175	159	47
	1/4 MHK	3x10 ⁹	10 ⁻³	6707	6627	89	30
P3	0	6,7x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2802	2722	368	5,5
	1/2 MHK	6,2x10 ⁸	10 ⁻³	5129	5049	68	109
	1/2 MHK	4,6x10 ⁸	10 ⁻³	7338	7258	98	213
	1/4 MHK	2,5x10 ⁹	10 ⁻⁴	2825	2745	370	148
	1/4 MHK	2,7x10 ⁹	10 ⁻⁴	1826	1746	236	87

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
P4	0	4,1x10 ¹⁰	10 ⁻²	5781	5701	8	0,19
	1/2 MHK	6,5x10 ⁸	10 ⁻¹	3355	3275	0,44	0,68
	1/2 MHK	6,3x10 ⁸	10 ⁻¹	959	879	0,12	0,19
	1/4 MHK	6,4x10 ⁹	10 ⁻²	4197	4117	5,6	0,87
	1/4 MHK	5,1x10 ⁹	10 ⁻²	4002	3922	5,3	1,04
P34	0	2,2x10 ¹⁰	10 ⁻³	1404	1324	18	0,8
	1/2 MHK	4,3x10 ⁸	10 ⁻²	4258	4178	5,6	13
	1/2 MHK	4,4x10 ⁸	10 ⁻²	4691	4611	6,2	14
	1/4 MHK	3,4x10 ⁹	10 ⁻³	750	670	9	2,6
	1/4 MHK	3,2x10 ⁹	10 ⁻³	752	672	9	2,8

¹ Minimale Hemmkonzentration (MHK) Ciprofloxacin

Leerwert: 80 CPM Referenzwert: 0,01µg Ela/ml = 2050 CPM

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
PAO1	0	2,9x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2471	2391	117	4
	0	1,3x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2140	2060	100	7,7
P2	0	1,3x 10 ¹⁰	10 ⁻⁴	1059	979	48	3,7
P4	1/2 MHK ¹	1,7x10 ⁹	10 ⁻²	1350	1270	0,62	0,36
P34	1/2 MHK	2,4x10 ⁹	10 ⁻³	1617	1537	7,5	3,1

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
7IIC4.1	0	6,4x10 ⁹	10 ⁻⁴	2485	2405	117	18,3
	0	6,9x10 ⁹	10 ⁻⁴	3569	3489	170	24,7
	0	6,5x10 ⁹	10 ⁻⁴	3314	3234	157	24,2
	1/2 MHK	1,2x10 ⁸	10 ⁻³	190	110	0,54	4,5
	1/2 MHK	1,1x10 ⁸	10 ⁻³	311	231	1,13	10,2
	1/4 MHK	1,4x10 ⁹	10 ⁻³	1151	1071	5,2	3,7
	1/4 MHK	9,6x10 ⁸	10 ⁻³	1108	1028	5	5,2
7VIII405.10		8,6x10 ⁹	10 ⁻⁴	524	444	22	2,6
	0	9,1x10 ⁹	10 ⁻⁴	448	368	18	2
	0	8,2x10 ⁹	10 ⁻⁴	331	251	12	1,5
	1/4 MHK	5x10 ⁷	10 ⁻³	159	79	0,39	7,8
	1/4 MHK	1,2x10 ⁸	10 ⁻³	618	538	2,62	21,9
	1/10 MHK	2,7x10 ⁹	10 ⁻⁴	155	75	3,7	1,4
	1/10 MHK	1,2x10 ⁹	10 ⁻⁴	210	130	6,3	5,2

¹ Minimale Hemmkonzentration (MHK) Ciprofloxacin

Leerwert: 70 CPM Referenzwert: 0,01µg Ela/ml = 1300 CPM

Stamm:	AB-Konz.	CFU	Verdünnung	CPM	CPM kor.	Ela µg/ml	µg Ela/mlx10 ⁹ Zellen
7II413.1	0	5,9 x10 ⁹	10 ⁻⁴	3076	3006	231	39,2
	0	6,7x10 ⁹	10 ⁻⁴	1687	1617	124	18,5
	0	6,9x10 ⁹	10 ⁻⁴	1839	1769	136	19,7
	1/2 MHK	1,8x10 ⁹	10 ⁻³	2230	2160	16,6	9,2
	1/2 MHK	1,1x10 ⁹	10 ⁻³	2811	2741	21,1	19,2
	1/2 MHK	2,3x10 ⁹	10 ⁻³	3067	2997	23,1	10
	1/4 MHK	1,8x10 ⁹	10 ⁻³	2863	2793	21,5	11,9
	1/4 MHK	9x10 ⁹	10 ⁻³	4281	4211	32,4	3,6
	1/4 MHK	6x10 ⁹	10 ⁻³	4148	4078	31,4	5,2
	1/10 MHK	4,5x10 ⁹	10 ⁻⁴	2092	2022	155	34
	1/10 MHK	9,5x10 ⁹	10 ⁻⁴	1992	1922	148	15,6
	1/10 MHK	6,2x10 ⁹	10 ⁻⁴	2081	2011	155	25
PAO1	1/10 MHK	4,4x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3174	3104	238	5,4
	1/10 MHK	2,4x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3684	3614	278	11,5
	1/10 MHK	3,5x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3762	3692	284	8,1
P2	1/10 MHK	6,1x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3372	3302	254	4,2
	1/10 MHK	3,1x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	2525	2455	189	6,1
	1/10 MHK	3,3x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3244	3174	244	7,4
P3	1/10 MHK	1,2x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3509	3439	265	22,1
	1/10 MHK	1,3x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3607	3537	271	20,1
	1/10 MHK	2,3x10 ¹⁰	10 ⁻⁴	3285	3215	247	10,7
P4	1/10 MHK	8x10 ⁹	10 ⁻³	1934	1864	14	1,8
	1/10 MHK	1,1x10 ¹⁰	10 ⁻³	2022	1952	15	1,4
	1/10 MHK	8,7x10 ⁹	10 ⁻³	1813	1743	13	1,5
P34	1/10 MHK	1,1x10 ¹⁰	10 ⁻³	2539	2479	19	1,7
	1/10 MHK	1,5x10 ¹⁰	10 ⁻³	2938	2878	22	1,5
	1/10 MHK	1,5x10 ¹⁰	10 ⁻³	2604	2534	19	1,3

6. Literaturverzeichnis

- [1] Anastassiou, E.D., Mintzas, A.S., Kounavis, C., and Dimitracopoulos, G. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 25:656-659, 1987.
- [2] Anerson, M.P., Rich, D.P. and Gregory, R.I. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, 251:679-682, 1992.
- [3] Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J. and Pulverer, G. *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Lübeck, 1994.
- [4] Buselmaier, W. and Tariverdian, G. *Humangenetik*. Springer-Verlag, Berlin, 1991
- [5] Bye, M.R., Ewing, J.M. and Quittell, L.M. Cystic fibrosis. *Lung*, 172:251-270, 1994
- [6] The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the ΔF 508 mutation: report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am. J. Hum. Gen.*, 47:354-359, 1990.
- [7] Dalhoff, A. and Döring, G. *Antibiotische Chemotherapie*, 39:205-214, Karger, Basel 1987.
- [8] Deretic, V., Govan, J.R.W., Konyecsni, W.M. and Martin, D.W. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Mutations in the *muc* Loci Affect Transcription of the *algR* and *algD* Genes in Response to Environmental Stimuli. *Molecular Microbiology*.
- [9] Döring, G., Conway, S.P., Heijerman, H.G.M., Hodson, M.E., Hoiby, N., Smyth and Touw, D.J. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.*, 16:749-767, 2000.
- [10] Döring, G. The Role of Neutrophil Elastase in Chronic Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 150: 114-117, 1994.
- [11] Dossinger, V. Einfluss subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen auf die Alginatproduktion von *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen, 1999.
- [12] Dupont, M-J. and Lapointe, J-R. Effect on *Pseudomonas aeruginosa* alginate expression of direct plating and culture of fresh cystic fibrosis sputum on to pseudomonas isolation agar containing subinhibitory concentrations of roxithromycin and rifampicin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 36:231-236, 1995.

-
- [13] FitzSimmons, S.C. *Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 1996 Annual Data Report*. Bethesda, Maryland, August 1997.
- [14] Govan, J.R. and V. Deretic, V. Pathogenesis in cystic fibrosis: mukoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burgholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.*, 60:539-574, 1996.
- [15] Govan, J.R. and Harris, G.S. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaption and pathogenesis. *Microbiol. Sci.*, 3:302-308, 1986.
- [16] Grimwood, K., To, M., Rabin, H.R. and Woods, D.E. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme expression by subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 33:41-47, 1989.
- [17] Grimwood, K, To, M., Rabin, H.R. and Woods, D.E. Subinhibitory antibiotics reduce *Pseudomonas aeruginosa* tissue injury in the rat lung model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24(6):937-45, 1989.
- [18] Hahn, H., Falke, D. and Klein, P. *Medizinische Mikrobiologie*. 2.Aufl. Springerverlag, Berlin, 1994.
- [19] Hodson, M.E. and Geddes, D.M. *Cystic Fibrosis*. Chapman & Hall, 1995.
- [20] Hoiby, N., Johansen, H.K., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O. and Kharazmi, A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes and Infection*, 3: 23-35, 2001.
- [21] Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496, 1962.
- [22] Ichimiya, T., Yamasaki, T. and Nasu, M. In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.*, 34:331-341, 1994.
- [23] Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J.R., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., Winson, M.K., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal* vol.12 no. 6 :2477-2482, 1993.

-
- [24] Kamath, S., Kapatral, V. and Chakrabarty, A.M. Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Molecular Microbiology*, 30:933-941, 1998.
- [25] Kartner, N., Hanrahan, J.W. and Jensen, T.J. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell*, 64:681-689, 1991.
- [26] Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
- [27] Kerem, B.-S., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M. and Tsui, L.-C. Identification of the cystic fibrosis gene; genetic analysis. *Science*, 245:1073-1080, 1989.
- [28] Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68:4839-4849, 2000.
- [29] Linker, A. and Jones, R.S. A polysaccharide resembling alginic acid from a pseudomonas microorganism. *Nature*, 204:187-188, 1964.
- [30] Linker, A. and Jones, R.S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *J. Biol. Chem.*, 241:3845-3851, 1966.
- [31] Löffler, G. and Petrides, P.E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin, 1997.
- [32] Lüllmann, H. and Mohr, K. *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999
- [33] Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P.W., Campbell, J.I.A., Jensen, P., Johnson, A.H., Givskov, M., Ohman D.E., Molin, S., Hoiby, N. and Kharazmi, A. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, 145:1349-1357, 1999.
- [34] May, T.B. and Chakrabarty, A.M. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Meth. Enzymol.*, 235:295-304, 1994.
- [35] Mohr, C.D., Rust, L., Albus, A.M., Iglewski, B.H. and Deretic, V. Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol-Microbiol.*, 4:2103-10, 1990.

-
- [36] Paresk, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. and Greenberg, E.P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:4360-4365, 1999.
- [37] Passarge, E. *Taschenatlas der Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
- [38] Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:197-201, 1994
- [39] Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg E.P. A second N- acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1490-1494, 1995.
- [40] Pearson, J.P., Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *Journal of Bacteriology*, 179:5756-5767, 1997.
- [41] Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. and Iglewski B.H. Quinolone signaling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11229-11234, 1999.
- [42] Petersen, S.S., Jensen, T., Pressler, T., Hoiby, N. and Rosendal, K. Does centralized treatment of cystic fibrosis increase the risk of *Pseudomonas aeruginosa* infection? *Acta Paediatr. Scand.*, 75:840-845, 1986.
- [43] Riede, U.-N. *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1998.
- [44] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelezaki, K., Zielenski, J., Lok, J., Plasic, S., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Ianuzzi, M.C., Collins, F.S. and Tsui, L.-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245:1066-1073, 1989.
- [45] Rommens, J.M., Ianuzzi, M.C., Kerem, B.-S., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Iidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.-C. and Collins, F.S. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245:1058-1065, 1989.
- [46] Schmidt, R.F. and Thews, G., *Physiologie des Menschen*. Springerverlag Berlin, 1995.

-
- [47] Simon, C. and Stille, W. *Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1993.
- [48] Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S. and Olson, M.V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406:959-964, 2000.
- [49] Welsh, M.J. and Smith, A.E. Mukoviszidose. *Spektrum der Wissenschaft . Digest: Gene und Genome*. 6:76-83, 1997.
- [50] Werner, H., Heizmann, W.R. and Döller, P.C. *Medizinische Mikrobiologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1991.
- [51] Whiteley, M., Lee, K.M. and Greenberg E.P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:13904- 13909, 1999.
- [52] Wolz, C., Hellstern, E., Haug, M., Galloway, D.R., Vasil, M.L. and Döring, G. *Pseudomonas aeruginosa* Las B mutant constructed by insertional mutagenesis reveals elastolytic activity due to alkaline proteinase and the Las A fragment. *Molecular Microbiology*, 5:2125-2131, 1991.
- [53] Worlitzsch D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A, Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C. and Döring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 109:317- 325, 2002.
- [54] Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H. and Yokota, T. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1749-1755, 1993.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. G. Döring für die Vergabe dieser Arbeit, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien, sowie für die Unterstützung und wertvollen Diskussionen.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. med. D. Worlitzsch für die engagierte Betreuung und Beratung zu Dank verpflichtet.

In den Dank einschließen möchte ich alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Familienname: Allgaier
Vorname: Stefan Oliver
Geburtsdatum: 06.04.1976
Geburtsort: Stuttgart
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Brigitte Allgaier, geb. Wagner
Dr. Jürgen Allgaier
Ausbildung: 1982 – 1986 Besuch der Silcher-Grundschule
in Kornwestheim
1986 – 1995 Besuch des Ernst-Sigle-Gymnasiums
in Kornwestheim
27.06.1995 Abitur
1995 – 1996 Zivildienst
1997 –2002 Studium der Medizin an der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen
06.04.1999 Ärztliche Vorprüfung
13.04.2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17.09.2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003 Studium am Lehrkrankenhaus Ludwigsburg
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
17.11.2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung